



Étude des antigènes embryonnaires dans les cellules souches de leucémie aiguë myéloïde

Tiphanie Picot

► To cite this version:

Tiphanie Picot. Étude des antigènes embryonnaires dans les cellules souches de leucémie aiguë myéloïde. Hématologie. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1159 . tel-01630075

HAL Id: tel-01630075

<https://theses.hal.science/tel-01630075>

Submitted on 7 Nov 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.



N°d'ordre NNT : 2017LYSE1159

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
I'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie, Biologie, Santé
Discipline : Biologie, Médecine, Santé

Soutenue publiquement le 22/09/2017, par :

Tiphanie PICOT

Etude des Antigènes Embryonnaires dans les Cellules Souches de Leucémie Aiguë Myéloïde

Devant le jury composé de :

WATTEL Eric, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon1

Président

WAGNER-BALLON Oriane, PU-PH, CHU Henri Mondor, Créteil

Rapporteure

PEREK Nathalie, PU, Université Jean Monnet Saint-Etienne

Rapporteure

MOREAUX Jérôme, MCU, CHRU de Montpellier

Rapporteur

GUYOTAT Denis, PU-PH, Université Jean Monnet Saint-Etienne

Examineur

CAMPOS Lydia, PU-PH, Université Jean Monnet Saint-Etienne

Directrice de Thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement :

Le **Professeur Lydia Campos** d'avoir dirigé ce travail de thèse. Merci de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir donné les moyens de travailler dans de bonnes conditions. Merci pour vos nombreuses remarques pertinentes et votre disponibilité. En plus de toutes vos connaissances scientifiques de qualité, j'ai appris énormément de choses à vos côtés. Je vous exprime ici mon plus profond respect.

Le **Professeur Orianne Wagner-Ballon** de l'honneur qu'elle m'a fait en ayant accepté avec spontanéité de prendre connaissance de ce travail et d'en être rapporteure.

Le **Professeur Nathalie Perek** qui a accepté de prendre connaissance et d'évaluer ce travail.

Le **Docteur Jérôme Moreaux** qui a gentiment accepté de consacrer son temps pour juger ce travail.

Le **Professeur Eric Wattel**, d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse et d'en être président. Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe. Merci pour vos conseils de tout début de thèse. Je suis heureuse de vous présenter le travail accompli.

Le **Professeur Denis Guyotat** de m'avoir accordé votre confiance. Merci pour l'aide, les conseils, la disponibilité et le soutien régulier dans mon travail de thèse, votre compétence et votre générosité scientifique et clinique sont pour moi un exemple.

Je n'aurai jamais pu réaliser ce travail de thèse sans le soutien d'un grand nombre de personnes, aussi je suis heureuse de remercier tous ceux qui m'ont entouré tout au long de ces années :

Merci au **Pr Pierre Jalinot** pour son accueil dans l'équipe de recherche et à toute ***l'équipe du laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule de Lyon***, pour les réunions de recherche et les conseils et idées prodigués tout au long de ma thèse.

Merci ***aux membres de l'association "les Amis de Rémi"*** pour le soutien financier et moral apporté, votre générosité m'a permis de faire cette thèse dans de très bonnes conditions. Je suis admirative de tous les efforts que vous fournissez pour cette belle association et je vous souhaite une bonne continuation pour les années à venir.

Merci à ***la société BD Biosciences*** pour l'aide apportée pour ce travail de recherche en me fournissant les anticorps nécessaires à sa réalisation dans de bonnes conditions.

Merci au ***laboratoire Virologie de l'ENS de Lyon*** et plus spécialement à ***Didier Negre et Caroline Costa*** pour leur accueil, leur disponibilité et leur aide dans la réalisation de mes manipulations d'inhibition sur les ShRNA.

Merci au ***Dr Carmen Aanei***. Merci pour ton soutien constant. Merci pour toutes ses discussions scientifiques et personnelles, pour tous ces bons moments.

Merci au **Dr Pascale Flandrin-Gresta**. Merci pour ta disponibilité. Merci pour m'avoir aidé dans la rédaction de cette thèse et pour toutes les discussions et bons conseils que tu m'as donné et qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions.

Merci aux **Drs Sylvie Tondeur, Pauline Noyel et Jérémie Stagnara** pour leur aide au cours de ce travail et pour leur conseil.

Merci au **Dr Christian Vasselon** pour les quelques discussions scientifiques et médicales qui m'ont beaucoup apporté.

Merci à **Sanae et Yuenv (dit Alexa)**, pour votre bonne humeur qui égayait mes journées quand nous partagions le bureau. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble. Merci aussi d'avoir partagé les moins bons moments, parce qu'on est plus forts quand on se serre les coudes. Merci pour votre amitié sans faille. Bonne continuation pour la suite de votre thèse.

Merci à **Kathy et Pascal** pour leur aide dans tout ce qui concerne l'administratif et surtout un grand merci à **Maryse** pour sa gentillesse et son aide précieuse pour que tout se déroule dans les meilleures conditions.

Merci à **Françoise, Eliane et Elisabeth**. Merci de votre compétence, votre patience et votre compréhension, qui m'ont permis de bien travailler.

Merci à **Béatrice, Sylviane et Jacques** pour leur gentillesse et leur aide dans mon travail de recherche.

Merci au trio de choc de cytométrie en flux : **Salima, Caroline et David**. Merci pour votre bonne humeur, vos conseils, vos compétences. Merci pour toutes les discussions et tous les bons moments passés ensemble. Grâce à vous, j'ai pu réaliser mon travail de thèse dans des conditions plus sereines.

Merci à **Bahia**, pour sa bonne humeur et ses encouragements.

Merci à **Fressia, Amandine, Anne, Marina, Jean Alain** pour vos encouragements, votre aide dans la partie clinique et pour les bons moments passés ensemble. Bonne chance dans la suite de vos carrières.

Merci à toute **l'équipe médicale du service Hématologie de l'Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth** pour leur aide constante avec les prélèvements et pour leur enthousiasme permanent pour la science.

Enfin, un grand MERCI à ma famille:

Merci à mes **parents**. Tout au long de mon cursus, vous m'avez toujours soutenu, encouragé et aidé. Vous avez toujours été là pour moi et n'avez jamais douté. L'aboutissement de ce travail c'est aussi grâce à vous.

Merci à mes deux frères **Nicolas et Sylvain**, dont l'affection, le soutien et les encouragements constants ont été d'un grand réconfort et ont contribué à l'aboutissement de ce travail

Merci à *Gwénaëlle, Lisa et Benjamin* pour leur joie de vivre, à *Yvonne, Nicole, Martine, Michel, Jean-Luc, Anthony, Arthur et ma très chère grand-mère* pour votre soutien et votre affection qui ont été un profond réconfort. Vous avez joué une part importante dans la réalisation de cette thèse.

Encore un grand merci à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable : ça y est, j'ai FINI mes études!!!

RESUME

Les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) représentent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes, caractérisées par une accumulation de progéniteurs myéloïdes indifférenciés. Cette accumulation proviendrait de l'existence de cellules souches leucémiques responsables de la résistance aux traitements et de la rechute de la maladie. Les Cellules Souches Leucémiques (CSL) se comportent comme les cellules souches embryonnaires, lesquelles expriment des marqueurs embryonnaires leur procurant des capacités de prolifération, d'autorenouvellement et d'absence de différenciation. Plusieurs études ont démontré le rôle des facteurs de transcription embryonnaires composant le réseau cœur de la pluripotence (OCT4, NANOG, et SOX2) et de marqueurs membranaires (SSEA1 et SSEA3) dans la cancérogénèse, mais peu de données concernent les LAM. Dans le but d'identifier le rôle fonctionnel des marqueurs embryonnaires dans la LAM, une évaluation de leur expression dans les compartiments CD34⁺ de cellules hématopoïétiques et leucémiques a été réalisée. Leur surexpression et leur implication dans les propriétés des cellules leucémiques nous laisse penser que ces antigènes embryonnaires (notamment OCT4), peuvent être utilisés comme marqueurs discriminants de la maladie résiduelle mais aussi comme cible thérapeutique potentielle. Cependant, les mécanismes de Leucémogénèse par lesquels les antigènes embryonnaires seraient impliqués restent encore à être élucidés.

ABSTRACT

Study of Embryonic Antigens in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells

Acute Myeloid Leukemias (AMLs) represent a heterogeneous group of malignant haemopathies, characterized by an accumulation of undifferentiated myeloid progenitors. This accumulation comes from the presence of Leukemic Stem Cells (LSCs) responsible for the resistance to treatment and relapse of the disease. LSCs behave as embryonic stem cells, which express embryonic markers giving them proliferation, self-renewal and lack of differentiation. Several studies have demonstrated the role of embryonic transcription factors composing the core network of pluripotency (OCT4, NANOG and SOX2) and membrane markers (SSEA1 and SSEA3) in carcinogenesis, but there is few data in AML. In order to identify the functional role of the embryonic markers in AML, an evaluation of their expression in haematopoietic and leukemic cells CD34⁺ compartments was carried out. Their overexpression and involvement in the properties of leukemic cells suggest that these embryonic antigens (especially OCT4), can be used as discriminating markers of residual disease as well as a potential therapeutic target. However, the mechanisms of leukemogenesis by which embryonic antigens are involved remain to be elucidated.

Mots clés:

Leucémie Aiguë Myéloïde

Cellules Souches Leucémiques

Marqueurs Embryonnaires

Maladie Résiduelle

Différenciation

Prolifération

Cible thérapeutique

Keywords:

Acute Myeloid Leukemia

Leukemic Stem Cells

Embryonic Markers

Residual Disease

Differentiation

Proliferation

Therapeutic target

Adresse du laboratoire:

Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule
Equipe « Contrôle de l'Expression Génétique et Oncogenèse Virale »
Pr P. Jalinot, Pr E. Wattel
UMR5239
ENS de Lyon
46, Allée d'Italie
69364 Lyon Cedex 07

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS	14
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	18
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	22
Chapitre I : L'Hématopoïèse.....	24
I- Hématopoïèse : préambule	25
II- Cellules souches	29
II-1. Les différents types de cellules souches	29
II-1. 1 Les cellules souches totipotentes	29
II-1.2 Les cellules souches pluripotentes	29
II-1.3 Les cellules souches multipotentes	30
II-1.4 Les cellules souches tri/bipotentes.....	30
II-1.5 Les cellules souches unipotentes	31
II-2. Les cellules souches hématopoïétiques	31
II-3. Les marqueurs de surface de la CSH.....	33
II-4. Les progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques	35
III- La niche hématopoïétique	40
Chapitre II : La Leucémogenèse.....	43
I- Le processus de Leucémogenèse	44
II- La cellule souche leucémique	49
II-1. Cellule Souche Leucémique : définition	49
II-2. Caractéristiques phénotypiques des cellules souches leucémiques	49
II-3. Comparaison entre cellules souches hématopoïétiques et leucémiques	51
III- La Leucémie Aiguë Myéloïde	53
III-1. Epidémiologie et physiopathologie	53
III-2. Classification OMS	53
III-3. Diagnostic et suivi phénotypique des hémopathies malignes	56

III-4. Traitements de la leucémie aiguë myéloïde	58
Chapitre III : Les Antigènes Embryonnaires	60
I- Origine et rôle des marqueurs embryonnaires	61
I-1. Les cellules souches embryonnaires	61
I-2. Cellules iPS	62
I-3. Propriétés des cellules souches embryonnaires	63
I-3.1 Un modèle de pluripotence	63
I-3.2 L'auto-renouvellement	64
I-3.3 La tumorigénicité	65
II- Les facteurs de transcription.....	65
II-1. Le facteur de transcription OCT4	66
II-1.1 Expression du facteur OCT4 au cours du développement embryonnaire.....	66
II-1.2 Rôle du facteur OCT4 dans l'auto-renouvellement	66
II-1.3 Profil d'expression d'OCT4 dans la tumorigénèse	67
II-1.4 OCT4 induirait la dérégulation d'autres protéines ou facteurs de transcription à travers différentes voies de signalisation	68
II-1.5 Dérégulation d'OCT4 contrôlée par des mécanismes épigénétiques.....	70
II-2. Le facteur de transcription NANOG.....	70
II-2.1 Fonction de NANOG	70
II-2.2 Identification de NANOG	71
II-2.3 Expression du facteur NANOG au cours du développement embryonnaire et rôle dans l'auto-renouvellement.....	71
II-2.4 Profil d'expression de NANOG dans la tumorigénèse	72
II-2.5 Régulation de NANOG par la voie de signalisation PI3K/AKT	73
II-3. Le facteur de transcription SOX2	74
II-3.1 Fonction de SOX2.....	74
II-3.2 Expression du facteur SOX2 au cours du développement embryonnaire et rôle dans l'auto-renouvellement.....	74

II-3.3 Profil d'expression de SOX2 dans la tumorigénèse.....	75
II-3.4 Régulation de SOX2 par la voie de signalisation FGF et par la protéine Klf4	76
II-3.5 Relation entre NOTCH/SOX2 dans les tumeurs solides	76
II-4. Interaction entre les trois facteurs de transcription OCT4/NANOG/SOX2	77
III- Les protéines membranaires.....	82
III-1. La protéine membranaire SSEA1	82
III-1.1 Expression de SSEA1 dans les cellules souches de glioblastome.....	83
III-1.2 Expression de SSEA1 dans le développement du système nerveux	83
III-1.3 Expression de SSEA1 au niveau des cellules mésenchymateuses	84
III-2. La protéine membranaire SSEA3.....	84
OBJECTIFS	86
MATERIEL & METHODES	88
I- Culture de lignées cellulaires.....	89
II- Marquages cellulaire par Cytométrie en Flux (CMF).....	89
II-1. Protocole technique	89
II-2. Stratégie d'analyse.....	91
III- Quantification génique / qRT-PCR.....	93
IV- Etude de la différenciation.....	95
V- Etude morphologique par cytopins.....	95
VI- Etude de la prolifération cellulaire par le test WST-1	96
VII- Tests clonogéniques	96
VIII- Inhibition par ShRNA	97
RESULTATS	101
Article 1	103
Article 2.....	114
Résultats préliminaires	127
Etude 1 : Voie de signalisation NOTCH.....	127

1. Introduction	127
2. Résultats.....	129
3. Conclusion	132
Etude 2 : Voie de signalisation Akt.....	132
1. Introduction	132
2. Résultats.....	133
3. Conclusion	136
DISCUSSION / PERSPECTIVES	137
Discussion	138
Perspectives	141
CONCLUSION GENERALE	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	146

ABBREVIATIONS

A-B

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ASXL1 : Additional Sex Combs Like 1

BFU : Burst Forming Unit

BFU-Meg : Burst Forming Unit
Mégacaryocytaire

C

CBF β -MYH11 : Core Binding Factor β -
Myosin Heavy chain 11

CEBPA : CCAAT/enhancer binding
protein alpha

CFU : Colony Forming Unit

CFU-Ba : Colony Forming Unit
Basophiles

CFU-S : Colony Forming Unit in Spleen

CFU-Eo : Colony Forming Unit
Eosinophiles

CFU-G : Colony Forming Unit
Granulocytaire

CFU-GEMM : Colonies mixtes Granulo-
Erythro-Mono-Macrophagiques

CFU-GM : Colony Forming Unit Granulo-
Macrophagique

CFU-M : Colony Forming Unit Mono-
Macrophagique

CFU-MK : Colony Forming Unit
Mégacaryocytaire

CLP : Progéniteur Lymphoïde Commun

CMP : Progéniteur Myéloïde Commun

CMEP : Progéniteur Myéloïde-Erythroïde
Commun

CMLP : Progéniteur Myéloïde-Lymphoïde
Commun

CSE : Cellule Souche Embryonnaire

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

D-E-F

DC : Cellules Dendritiques

DLL : Delta Like

DNMT3A : DNMT3A DNA
methyltransferase 3 alpha

EGIL: European Group for the
Immunologic Classification of Leukaemia

EP : Progéniteur Erythrocytaire

Esrrb : Estrogen-related receptor β

EZH2 : Histone-lysine N-
methyltransferase

FLT3 : Receptor-type Tyrosine-Protein
Kinase

FSC: Forward Scatter

G-I

GEIL : Groupe pour l'Etude
Immunophénotypique des Leucémies

GMP : Progéniteur Myéloïde
Granulocytaire

GMP : Progéniteur commun
Granulocytaire Monocytaire

GP : Progéniteurs Granulocytaires

IDH : Isocitrate déshydrogénase

iPS : Cellules Souches Pluripotentes
Induites

IPSS : International Prognostic Scoring System

J-K

JAK : Janus Kinase

Klf4 : Kruppel-like Factor 4

KLS : c-kit+, Lin-, Sca-1+

KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

L

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoïde

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

Lin : Lineage (marqueur de lignée)

LMPP : Progéniteur Multipotent biaisé Lymphoïde

LTRC : Long-Term Repopulating cells

M-N

MacP : Progéniteurs Macrophages

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MBP : Progéniteurs Myéloïde des cellules B

MCI : Masse Cellulaire Interne

ME : progéniteur commun myéloïde-érythroïde

MEF : Cellules Nourricières sécrétant du LIF

MEP : Progéniteur Erythrocytaire/Mégacaryocytaire

METB : Cellule Souche Hématopoïétique

MiRNAs : Micro-ARNs

MkP : Progéniteurs Mégacaryocytaires

MPO : Myélopéroxydase

MPP : Progéniteur Multipotent

MRD : Maladie Résiduelle

MTB : Progéniteurs Myéloïde cellules T

NGS : Next Generation Sequencing

NK : Cellule Natural Killer

NPM1 : Nucleophosmin 1

NRAS : Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OCT4 : Octamer 4

PHF6 : PHD finger protein 6

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PML-RAR α : Promyelocytic Leukemia-Récepteur Acide Rétinoïque α

R-S

RAD21 : Double-strand-break repair protein rad21 homolog

Rif1 : Rap1 interacting factor 1 homolog

RUNX1-RUNX1T1 : Runt-related transcription factor 1- translocation partner 1

Sca-1 : Stem Cell Antigen 1

SCF : Stem Cell Factor

SCID : Severe Combined ImmunoDeficient

ShRNA : Short hairpin RiboNucleic Acid

SMC : Structural maintenance of
chromosomes protein

SOX2 : Sex determining region-Y box 2

STAG2 : Stromal antigen 2

STAT3 : Signal Transducer and Activator
of Transcription 3

STRC : Short Term Repopulating cells

SRSF2 : Serine/arginine-rich splicing
factor 2

SSC: Side Scatter

SSEA1 : Stage Specific Embryonic
Antigen-1

SSEA3 : Stage Specific Embryonic
Antigen-3

T-U-V-W

TB : progéniteur commun lymphoïde

Tbx3 : T-box 3

Tcl1 : T-cell lymphoma breakpoint 1

TET2 : Tet methylcytosine dioxygenase 2

U2AF1 : U2 small nuclear RNA auxiliary
factor 1

VSEL : Very Small Embryonic Like Stem
Cells

WT1 : Wilms tumor protein

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des Figures

Figure 1 : Les différents sites de l'Hématopoïèse.....	26
Figure 2 : Hiérarchie de l'Hématopoïèse	28
Figure 3 : Evolution de l'expression des marqueurs de surface au cours de l'hématopoïèse normale.....	35
Figure 4 : Modèle classique dichotomique de l'hématopoïèse	36
Figure 5 : Modèle de l'hématopoïèse avec une origine myéloïde	37
Figure 6 : Autres modèles d'hématopoïèse.....	38
Figure 7 : Progéniteurs hématopoïétiques médullaires myéloïdes et marqueurs antigéniques	39
Figure 8 : Les différents compartiments de la moelle osseuse hématopoïétique	40
Figure 9 : La niche des Cellules Souches Hématopoïétiques.....	41
Figure 10 : Représentation de la niche vasculaire.....	42
Figure 11 : Développement de la leucémie aigüe myéloïde	44
Figure 12 : Comparaison entre hématopoïèse normale et leucémique.....	45
Figure 13 : Acquisition des mutations précoces et tardives dans les LAM	48
Figure 14 : Différence d'expression entre cellule souche hématopoïétique et cellule souche leucémique	52
Figure 15 : Relations entre l'expression d'OCT 3/4 et le sort des cellules souches	67
Figure 16 : Motifs de régulation transcriptionnelle dans les cellules souches embryonnaires humaines	79
Figure 17 : Réseau de régulation transcriptionnelle mis en place par NANOG, OCT4 et SOX2 dans les cellules souches embryonnaires.....	81
Figure 18 : Stratégie d'analyse par Cytométrie en Flux	92
Figure 19: Carte de restriction du vecteur pLKO.1-puro et du vecteur témoin SHC001	99
Figure 20 : Expression des quatre protéines NOTCH et des ligands associés dans différents compartiments leucémiques	129
Figure 21 : Expression des quatre protéines NOTCH et des ligands associés avant et après différenciation	130
Figure 22 : Expression de CD11b et des marqueurs embryonnaires avant et après inhibition	131

Figure 23 : Expression d'Akt dans différents compartiments leucémiques	133
Figure 24 : Expression des marqueurs embryonnaires avant et après inhibition d'Akt.....	134
Figure 25 : Nombre de colonies avant et après inhibition d'AKT	135
Figure 26 : Pourcentage de prolifération cellulaire avant et après inhibition d'AKT	135

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les trois grandes catégories de mutations des LAM	47
Tableau 2: Surexpression et absence d'expression de marqueurs de surface sur les cellules souches leucémiques CD34 ⁺ CD38 ⁻	50
Tableau 3 : Expression, surexpression et absence d'expression de marqueurs de surface sur les cellules souches leucémiques CD34 ⁺ CD38 ⁻	52
Tableau 4 : Classification OMS 2016	55
Tableau 5 : Expression des marqueurs de surface et cytoplasmiques pour le diagnostic de LAM et LA à phénotype mixte	57
Tableau 6 : Anticorps utilisés en cytométrie en Flux	93
Tableau 7 : Amorces utilisées en qRT-PCR	94

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Mon travail a porté sur l'étude de l'expression des antigènes embryonnaires dans les cellules souches de Leucémie Aiguë Myéloïde. Nous avons notamment analysé leur expression au niveau des cellules souches hématopoïétiques et des cellules souches leucémiques. Il s'agit à terme, de pouvoir mieux caractériser la cellule souche leucémique, qui pourrait être responsable de la rechute de la maladie, afin de pouvoir l'éradiquer par des traitements ciblés.

Ainsi, nous présenterons dans une première partie une vue globale de l'hématopoïèse et des différents facteurs intervenant au cours de la production de cellules sanguines ainsi que le concept de la cellule souche hématopoïétique avec les marqueurs présents qui permettent de l'identifier.

La seconde partie permettra de définir la leucémie aiguë myéloïde et les caractéristiques de la cellule souche leucémique, les divers facteurs intervenant dans la transformation maligne des cellules hématopoïétiques en cellules leucémiques et les traitements actuels utilisés.

Enfin, dans une troisième partie, nous définirons les caractéristiques des différents marqueurs embryonnaires présents dans les cellules souches embryonnaires et les mécanismes biologiques et moléculaires présents.

Chapitre I : L'Hématopoïèse

I- Hématopoïèse : préambule

En rapport avec son étymologie venant du grec ancien *haïmatos* (« sang ») et *poiësis* (« création »), l'hématopoïèse correspond à l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production de diverses cellules sanguines matures. Le sang est un liquide qui permet d'approvisionner les organes et les tissus de l'organisme en oxygène et différents nutriments essentiels, tout en protégeant l'organisme. L'hématopoïèse est un processus complexe, dynamique et finement régulé au cours duquel les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui se situent dans un microenvironnement spécifique, s'auto-renouvellent et se différencient en cellules appartenant à différents lignages hématopoïétiques : lymphocytes B et lymphocytes T constituant le lignage lymphoïde, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes, macrophages (« granuleux »), plaquettes et érythrocytes constituant le lignage myéloïde. L'hématopoïèse apparaît précocement au cours de l'embryogénèse et est maintenue tout au long de la vie. La plupart des cellules sanguines matures ayant une durée de vie limitée (polynucléaires et monocytes : un jour, plaquettes : huit jours, hématies : 120 jours), il existe un renouvellement constant et continu de ces cellules. De plus, afin de maintenir cette homéostasie et de combler les besoins fonctionnels de l'organisme, le système peut répondre à des états de stress physiologiques tels que saignements ou infections par exemple. L'hématopoïèse est donc caractérisée par un grand pouvoir de différenciation, un haut taux de prolifération et une grande capacité d'adaptation, avec augmentation de la production d'une seule lignée si besoin. La possibilité d'obtenir des colonies hématopoïétiques en culture a permis la découverte de cytokines et de molécules extracellulaires comme les facteurs de croissance qui guident la prolifération et la différenciation de progéniteurs médullaires spécifiques. Elle est également caractérisée par la présence de molécules intracytoplasmiques tels que les récepteurs et voies de transduction du signal et la présence de molécules intranucléaires comme les facteurs de transcription qui peuvent affecter l'expression de gènes spécifiques.

Au cours de l'ontogénèse hématopoïétique, nous pouvons observer une évolution séquentielle en différentes localisations anatomiques. En effet, durant l'hématopoïèse primitive qui débute à J21 de la vie embryonnaire, les cellules centrales présentes au niveau des îlots sanguins se forment dans le mésoderme du sac vitellin et vont se différencier en cellules érythroblastiques (nucléées) et les cellules de la périphérie vont former les premières cellules endothéliales (c'est-à-dire les vaisseaux primitifs). Par la suite, durant l'hématopoïèse définitive débutant à J28, les cellules souches hématopoïétiques, encore imparfaitement

caractérisées, apparaissent dans l'aorte dorsale de la région Aorte-Gonades-Mesonephros, puis iront coloniser le foie puis la rate. La dernière localisation anatomique sera la moelle osseuse qui commence à être colonisée vers 4 mois et sera le site exclusif de l'hématopoïèse à la naissance et durant toute la vie (Cumano and Godin 2007).

Le système hématopoïétique est un ensemble de tissus disséminés dans différents organes tels que la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, la rate, le pharynx et le chorion des muqueuses digestives. Toutes les cellules sanguines sont générées dans la moelle à l'exception des lymphocytes T qui terminent leur différenciation dans le thymus. De plus, les lymphocytes T et B subissent de nombreuses maturations au niveau des organes lymphoïdes secondaires tels que la rate ou les ganglions lymphatiques lors de la rencontre avec des antigènes spécifiques (*Figure 1*) (Kawamoto and Katsura 2009).

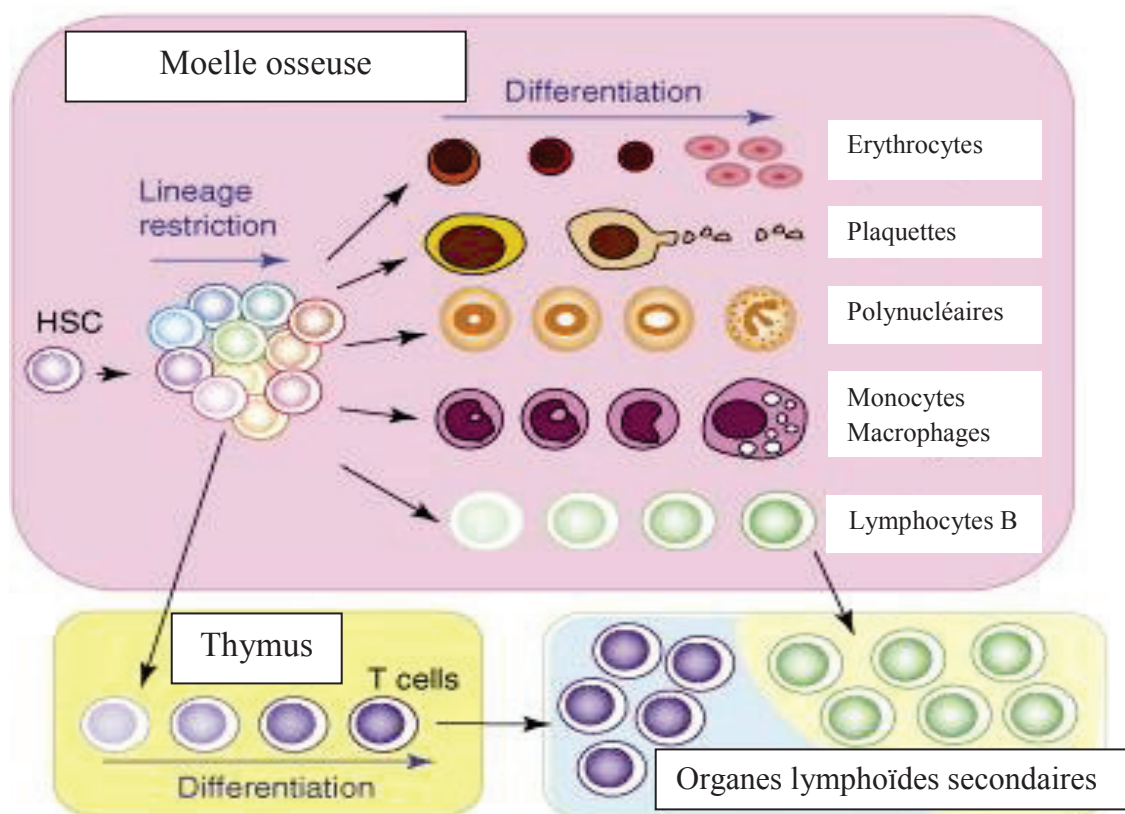


Figure 1 : Les différents sites de l'Hématopoïèse (Kawamoto and Katsura, *Trends in Immunology*, 2009)

L'hématopoïèse est un processus complexe, encore imparfaitement compris, souvent issu d'extrapolations de l'animal à l'homme. Des altérations de l'hématopoïèse peuvent conduire à diverses pathologies, réactionnelles (aplasies) ou malignes (hémopathies). Son importance clinique a largement contribué à son exploration intense. Les pathologies hématologiques bénignes et les insuffisances médullaires, mais aussi les hémopathies malignes telles que leucémies, lymphomes, syndromes myélodysplasiques ou syndromes myéloprolifératifs touchent les cellules hématopoïétiques. La capacité des CSH à s'auto-renouveler et à se différencier dans les multiples lignages du sang font de ces cellules une source utilisable en clinique. La transplantation de CSH est couramment utilisée pour les traitements de maladies hématologiques, leucémies et immunodéficiences.

L'hématopoïèse s'organise à partir de trois catégories de constituants, la trame de la moelle osseuse, les facteurs de régulation et les cellules hématopoïétiques.

- La trame de la moelle est constituée de plusieurs types cellulaires et intervient dans la survie, la prolifération et dans l'orientation des cellules hématopoïétiques.
- Les facteurs de régulation sont un réseau complexe de molécules pouvant agir à plusieurs niveaux de façon spécifique ou non. Ils ont un rôle stimulant ou inhibiteur et ils sont produits par divers types cellulaires tels que les fibroblastes, monocytes, cellules endothéliales et lymphocytes.
- Les cellules hématopoïétiques peuvent être regroupées en quatre compartiments répondant à des niveaux de différenciation croissante (*Figure 2*) (Chotinantakul and Leraanansaksiri 2012).

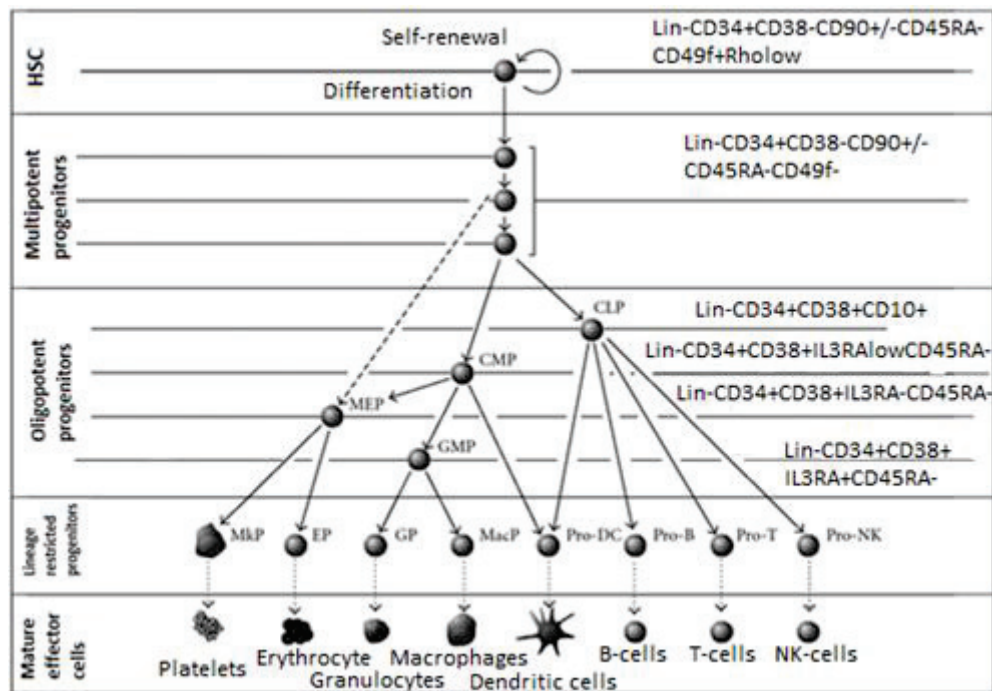


Figure 2 : Hiérarchie de l'Hématopoïèse (Chotinantakul and Ileanansaksiri, Bone Marrow Research, 2012)

CLP : Progéniteur Lymphoïde Commun ; CMP : Progéniteur Myéloïde Commun ; DC : Cellule Dendritique ; EP : Progéniteur Erythrocytaire ; GMP : Progéniteur Myéloïde Granulocytaire ; GP : Progéniteur Granulocytaire ; HSC : Cellule Souche Hématopoïétique ; MacP : Progéniteur Macrophage ; MEP : Progéniteur Erythrocytaire/Mégacaryocytaire ; Mkp : Progéniteur Mégacaryocytaire ; NK : Cellule Natural Killer ; Lin : marqueur de lignées.

- Le premier compartiment comprend les **cellules souches** qui sont capables de donner naissance à toutes les lignées sanguines. Les cellules souches pluripotentes ont la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation pour donner naissance à l'ensemble des lignées myéloïdes et lymphoïdes. Elles ont également la capacité de produire une restauration hématologique.
- Le second est celui des **progéniteurs** qui proviennent des cellules souches et qui ont un moindre pouvoir d'auto-renouvellement mais qui se différencient dans une ou plusieurs directions.
- Les **précurseurs** du troisième compartiment sont les premières cellules reconnaissables de chaque lignée qui n'ont plus de pouvoir d'auto-renouvellement et dont la capacité de prolifération est limitée.
- Dans le quatrième compartiment, nous avons les **cellules sanguines matures** qui sont des cellules différenciées et matures tels que les érythrocytes, les monocytes ou les plaquettes.

II- Cellules souches

Les cellules souches qui sont des cellules indifférenciées possèdent une capacité d'auto-renouvellement à l'identique et de différenciation en type(s) cellulaires(s) spécifique(s). Ce terme de cellule souche a été introduit pour la première fois en 1883 (NEET 2017). Au stade embryonnaire, elles vont conduire à la formation des différents tissus qui constitueront l'organisme. Dans l'organisme adulte, elles se localisent dans des endroits protégés appelés « niches ». Les cellules souches adultes permettent la régénération des tissus et ainsi le maintien de l'homéostasie tissulaire. De manière globale, les cellules souches sont trouvées chez tous les êtres vivants multicellulaires.

II-1. Les différents types de cellules souches

Lors du développement embryonnaire, la capacité de différenciation des cellules souches va diminuer et ainsi nous pouvons distinguer différentes catégories de cellules souches.

II-1. 1 Les cellules souches totipotentes

Les cellules souches totipotentes sont des cellules provenant des premières divisions de l'ovocyte fécondé (zygote) jusqu'au stade morula constitué de 8 à 16 cellules. Ces cellules sont caractérisées par leur aptitude à se différencier en n'importe quelle cellule spécialisée de type cellules musculaires ou cellules neuronales.

De plus, ces cellules possèdent la capacité de former les annexes embryonnaires, organes assurant la survie et les fonctions vitales de l'embryon, puis du fœtus. Par exemple, chez les mammifères placentaires, les annexes embryonnaires correspondent au placenta, au sac amniotique (ou amnios) et au liquide amniotique. Lorsque la morula se divise en deux (scission embryonnaire), deux embryons sont obtenus possédant des gènes identiques (vrais jumeaux ou jumeaux monozygotiques). Ainsi, ces cellules sont les seules capables de pouvoir conduire in vivo au développement d'un organisme entier.

II-1.2 Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes peuvent se différencier vers les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme). Elles sont ainsi capables de pouvoir conduire in vivo à l'ensemble des tissus constituant un organisme. Néanmoins, ces cellules ne sont pas capables de conduire aux annexes embryonnaires.

Il existe plusieurs origines possibles de ces cellules souches au cours du développement : les cellules souches embryonnaires dérivées de la masse cellulaire interne (MCI) du blastocyste pré-implantatoire, les cellules souches épiblastiques dérivées de l'épiblaste embryonnaire (feuillet cellulaire issu de la MCI et à l'origine des trois feuillets embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme), les cellules embryonnaires germinales provenant des cellules germinales primordiales de l'embryon, les cellules embryonnaires de carcinome qui sont des cellules indifférenciées de tératocarcinomes (tumeurs malignes composées de différents types de cellules différenciées et de cellules indifférenciées), de cellules pluripotentes tels que les CSE, les cellules souches germinales multipotentes issues de cellules germinales du nouveau-né ou de l'adulte et enfin les cellules souches induites à la pluripotence obtenues par reprogrammation de cellules somatiques (Kieffer, Kuntz, and Viville 2010).

II-1.3 Les cellules souches multipotentes

Contrairement aux cellules souches pluripotentes, les cellules souches multipotentes ont une capacité de différenciation diminuée. En effet, ces cellules sont à l'origine de plusieurs types cellulaires, mais sont déjà engagées dans un programme de différenciation tissulaire spécifique. Ces cellules sont présentes au cours du développement embryonnaire, mais également chez l'adulte. Parmi les cellules souches multipotentes, on distingue notamment les cellules souches hématopoïétiques qui sont nichées au niveau de la moelle osseuse et qui donnent naissance aux cellules sanguines (Erythrocyte, Leucocyte, Thrombocyte) (Doan and Chute 2012; Larsson et al. 2003), les cellules souches mésenchymateuses qui sont également présentes au niveau de la moelle osseuse et qui sont à l'origine des cellules des lignages ostéoblastiques, chondroblastiques, adipocytaires et stromales (Kaltz et al. 2010; da Silva Meirelles et al. 2009; Solchaga et al. 2010), les cellules souches neurales qui sont localisées au niveau de deux zones dans le cerveau adulte : la zone sous-ventriculaire et le gyrus denté de l'hippocampe et qui peuvent se différencier en neurones et en cellules gliales (Encinas and Enikolopov 2008).

II-1.4 Les cellules souches tri/bipotentes

Les cellules souches tripotentes ou bipotentes peuvent se différencier respectivement en trois ou deux types cellulaires. Elles sont localisées au niveau de la moelle et on peut distinguer : les cellules souches chondroostéo-adipogéniques et les cellules souches chondro-ostéogéniques (Pittenger et al. 1999; Prockop 1997).

II-1.5 Les cellules souches unipotentes

Les cellules souches unipotentes quant à elles ne peuvent se différencier qu'en un seul type cellulaire, et on distingue notamment les adipoblastes, les cellules de l'épithélium de la muqueuse gastro-intestinale, les cellules satellites du muscle, les cellules ovales du foie et les kératinocytes de la peau (G Ailhaud, P Grimaldi, and Négrel 1992; Biressi and Rando 2010; Bjerknes and Cheng 2002; Coulombel 2003).

II-2. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont présentes en très petit nombre dans la moelle osseuse (0,01% à 0,05%), pourtant elles produisent des milliards de cellules sanguines chaque jour, et ce, durant toute la vie d'un individu. Pour ce faire, elles sont douées de deux propriétés principales qui, combinées ensemble permettent aux CSH de se maintenir en nombre constant tout en assurant en permanence la régénération du sang. La première propriété est la capacité d'auto-renouvellement, par le maintien de leur homéostasie et la naissance d'autre CSH. Ainsi, un individu conserve un pool de cellules souches tout au long de sa vie. La deuxième propriété est leur capacité à se différencier en de multiples lignées de cellules sanguines. Tout en proliférant et au cours de divisions cellulaires successives, les CSH se spécialisent et acquièrent progressivement les propriétés de plusieurs types cellulaires différents, ce qui leur confèrent la caractéristique de multipotence. Cette seconde propriété se réalise selon un processus finement régulé, coordonné et selon une hiérarchie harmonieuse de cellules en maturation : progéniteurs puis précurseurs hématopoïétiques. Les CSH les plus primitives peuvent reconstituer l'ensemble des compartiments cellulaires du tissu hématopoïétique. Certaines de ces CSH restent dans un état de quiescence (Cheng et al. 2000). Le microenvironnement médullaire crée des niches hématopoïétiques (niche ostéoblastique et niche vasculaire) qui jouent un rôle central dans la régulation de leurs propriétés (Wilson and Trumpp 2006). Auto-renouvellement et différenciation sont contrôlés par un complexe d'interactions entre les mécanismes intrinsèques et les signaux extrinsèques envoyés par la niche hématopoïétique.

En 1961, les travaux de Till et McCulloch ont montré l'existence pour la première fois de cellules souches hématopoïétiques (Till and McCulloch 2010). En effet, il était connu que l'injection de cellules de moelle osseuse à un receveur syngénique irradié le protège de la mort par déplétion hématopoïétique, ce qui, tout en confortant les caractéristiques fondamentales des cellules souches, ajoutait à leur potentiel celui de la transplantabilité (Ford

et al. 1956). Till et McCulloch constatèrent que l'injection d'un nombre réduit de cellules de moelle provoquait dans la rate des souris irradiées, l'apparition en sept à huit jours de nodules hématopoïétiques, nodules fréquemment constitués de plusieurs lignages hématopoïétiques. Il fut démontré ultérieurement que ces colonies spléniques étaient d'origine clonale (A. M. Wu et al. 1967), qu'elles contenaient plusieurs lignages cellulaires (Lewis and Trobaugh 1964) et que leur transplantation chez des receveurs secondaires donnait à nouveau des colonies spléniques (Curry and Trentin 1967). Les cellules à l'origine de ces colonies spléniques sont des progéniteurs hématopoïétiques médullaires capables de reconstituer l'hématopoïèse de souris létalement irradiées, et dénommées pour cela *Colony Forming Unit in spleen* (CFU-S)). Elles furent considérées pendant des années comme représentant la cellule souche, unique, multipotente et douée d'auto-renouvellement (Becker, McCULLOCH, and Till 1963). Les modèles xénogéniques de greffe de cellules humaines à des souris immunodéficientes (Severe Combined ImmunoDeficient [SCID]) utilisés pour tester la capacité d'une cellule à reconstituer l'hématopoïèse humaine (Shultz, Ishikawa, and Greiner 2007) ont permis de mettre en évidence une grande hétérogénéité au sein du compartiment des CSH et des progéniteurs.

Deux sous-populations de CSH peuvent être distinguées : les CSH à potentiel de reconstitution à long terme, les *Long-Term Repopulating Cells* (LTRC) et les CSH à potentiel de reconstitution à court terme, les *Short-Term Repopulating Cells* (STRC) (Bhatia et al. 1998; Zhong, Astle, and Harrison 1996). Les LTRC sont de fréquences très faibles et ont une capacité de reconstitution à long terme. Elles sont présentes au niveau d'une rare population cellulaire $CD34^{+}CD38^{-}$, de la niche des cellules souches, et maintiennent une activité de souchitude en contrôlant l'homéostasie hématopoïétique et en créant un pool de cellules souches qui restent en état quiescence (Yahata et al. 2008). Les STRC quant à elles ont une capacité de reconstitution à court terme, elles sont de fréquences très fortes dans le sang périphérique de l'adulte par rapport au sang de cordon du nouveau-né mais la durée de leur contribution à l'hématopoïèse reste incertaine (Zavidij et al. 2010).

La CSH est la plus précoce que l'on est capable d'identifier, elle a été nommée cellule initiatrice de culture à long terme, *long-term culture-initiating cell* (LTC-IC). Il s'agit d'un type cellulaire très rare (1/100 000 cellules médullaires) identifié en 1995, soit 33 ans après la découverte des premiers précurseurs médullaires (Lemieux et al. 1995). Après 4 à 5 semaines de culture de cellules médullaires sur cellules stromales, apparaissent des colonies de cellules hématopoïétiques.

II-3. Les marqueurs de surface de la CSH

La définition des CSH est donc purement fonctionnelle, elles ne sont pas reconnaissables morphologiquement et il n'existe pas chez l'homme de marqueur génétique ou protéique unique permettant de les identifier de manière spécifique. Il est cependant possible d'utiliser une combinaison de différents marqueurs plus ou moins spécifiques. L'antigène CD34 est un marqueur essentiel de CSH humaines, également exprimé sur les progéniteurs précoces déjà engagés et les cellules endothéliales (Andrews, Singer, and Bernstein 1986; Fina et al. 1990). C'est une protéine transmembranaire glycosylée, membre de la famille des sialomucines, de fonction encore mal définie (Krause et al. 1996). En effet, il pourrait être impliqué dans l'adhérence (Drew et al. 2005) ou dans la régulation de la différenciation (Nakamura, Komano, and Nakauchi 1993). Les cellules CD34⁺ représentent 0,5% des cellules médullaires. La population de CSH peut ainsi être déterminée par la présence du CD34, associée à l'absence de marqueurs antigéniques de lignées différenciées (Lin⁻) et l'absence du marqueur HLA-DR. L'antigène CD133 ou prominine 1 (PROM1) sert parfois de marqueur de CSH, il est également présent sur les progéniteurs et sur d'autres cellules souches adultes. Il permettrait le maintien des propriétés de cellules souches en empêchant la différenciation (Fargeas, Huttner, and Corbeil 2007). L'antigène CD38 est souvent utilisé en complément du CD34. Son expression est réversible selon l'état d'activation des CSH (Tajima et al. 2001). A l'inverse du CD34, une déplétion du CD38 est utilisée pour enrichir une fraction en CSH car il ne serait pas présent à la membrane des cellules les plus primitives (Novelli, Ramirez, and Civin 1998). Il permet ainsi de distinguer les CSH précoces et moins précoces. La population CD34⁺CD38⁻ correspondrait aux LTRC, alors que la population CD34⁺CD38⁺ aurait une activité de STRC. Des CSH CD34⁻ avec des capacités de reconstitution hématopoïétique à long terme ont été mises en évidence chez la souris (Osawa et al. 1996). Au cours de la culture de ces CSH CD34⁻ on observe l'acquisition du marqueur CD34⁺, suggérant que les cellules CD34⁻ précéderaient les CD34⁺. Les CD34⁺ pourraient retourner vers un phénotype CD34⁻ dans certaines circonstances (Dao and Nolte 2000).

Les cellules CD34⁺ sont utilisées en clinique au cours des greffes pour leur capacité à restaurer l'hématopoïèse dans le traitement de nombreuses pathologies malignes (Burt et al. 2008).

Il est important de se rappeler que les cellules CD34⁺ correspondent à une population hétérogène de cellules comprenant les cellules souches, mais également les progéniteurs multipotents et les progéniteurs restreints à une lignée.

La combinaison des marqueurs CD117 (c-kit), Lin⁻ (lineage minus), Sca-1 (Stem Cell Antigen 1) est aussi fréquemment utilisée pour obtenir une fraction enrichie en CSH et progéniteurs précoces dite KLS. Le c-kit est le récepteur au SCF (Stem Cell Factor) dont l'expression diminue au cours de la différenciation (Sharma et al. 2006). La sélection Lin⁻ permet d'éliminer les cellules engagées qui expriment des marqueurs spécifiques de leur différenciation. L'antigène Sca-1 est présent sur les CSH et les progéniteurs précoces, et disparaît très rapidement lors de l'engagement. La combinaison de ces trois marqueurs pour sélectionner une population Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺ permet d'obtenir les cellules dites KLS (Osawa et al. 1996). Le CD90 ou Thy1 est un marqueur exprimé sur certaines CSH (Baum et al. 1992). Il contribue aux mécanismes d'adhésion et de migration. Pour enrichir une fraction en CSH, il est souvent couplé à la sélection Lin-Sca-1⁺ pour définir la population Lin⁻Sca-1⁺Thy^{low} (Spangrude and Brooks 1992). Les principaux marqueurs exprimés au cours de l'hématopoïèse sont résumés dans la Figure3 (Weissman and Shizuru 2008).

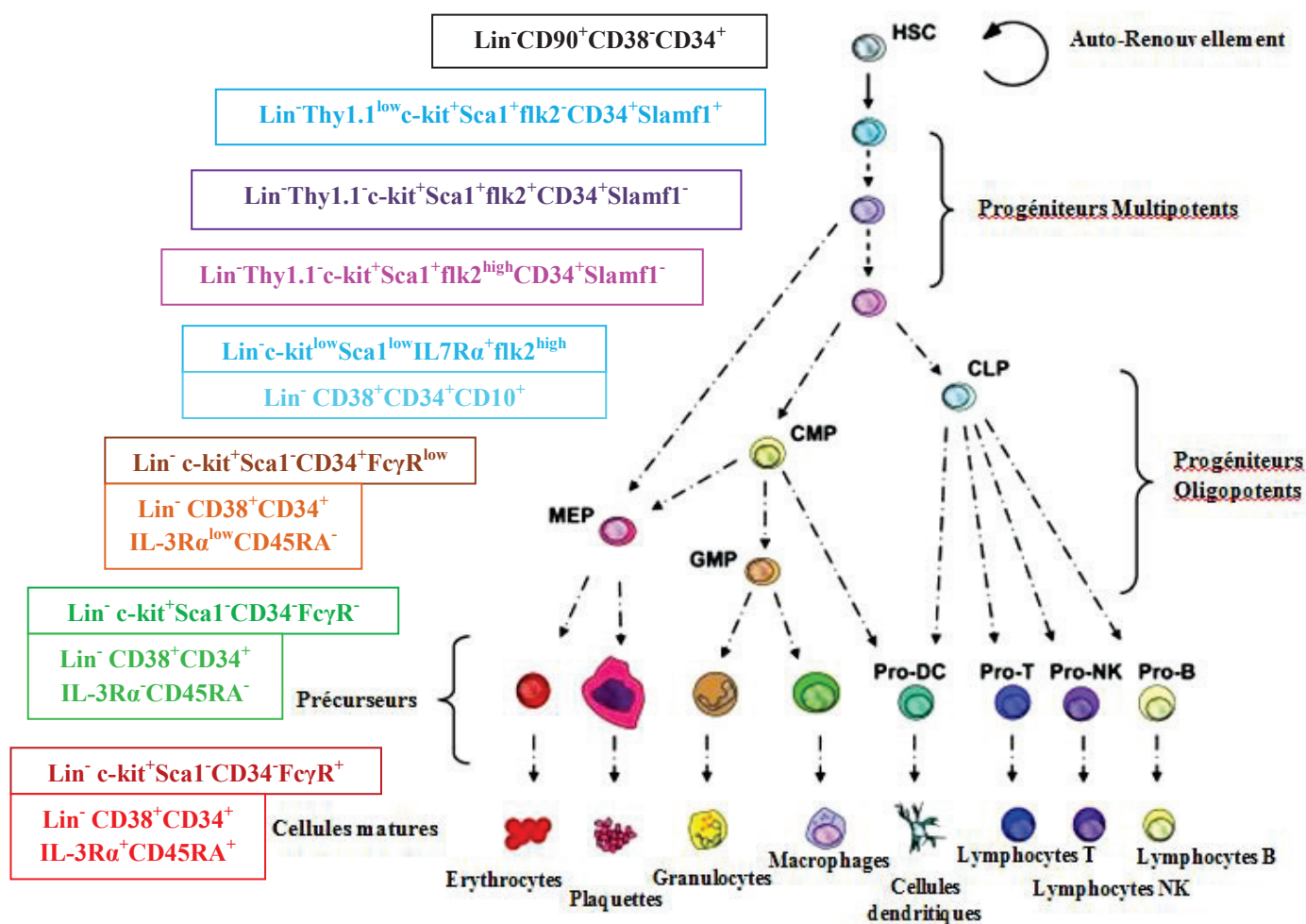


Figure 3 : Evolution de l'expression des marqueurs de surface au cours de l'hématopoïèse normale (Adapté de Bryder et al, American Journal of Pathology, 2006)

HSC : Cellule Souche Hématopoïétique, CMP : Progéniteur Commun Myéloïde, MEP : Progéniteur Commun Erythroblastique-Mégacaryocytaire, CLP : Progéniteur Lymphoïde Commun, GMP : Progéniteur Granulocytaire-Monocytaire

En utilisant des marqueurs plus spécifiques, il serait possible de trier les véritables cellules souches, mais de tels marqueurs n'existent pas encore chez l'homme et l'utilisation en pratique de ces marqueurs poserait le problème de la rareté des cellules à isoler.

II-4. Les progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques

Les progéniteurs hématopoïétiques sont communs à plusieurs lignées, myéloïde ou lymphoïde, puis deviennent spécifiques des lignées lorsqu'ils deviennent des progéniteurs engagés.

Les progéniteurs lymphoïdes communs peuvent se différencier en tous types de lymphocytes sans potentiel myéloïde notable (Kondo et al. 2000). Toutefois, certains gènes apparentés myéloïdes peuvent être détectés dans les progéniteurs communs lymphoïdes, selon

des conditions physiologiques spécifiques (Delogu et al. 2006). De même, les progéniteurs communs myéloïdes peuvent donner naissance à toutes les classes de cellules myéloïdes dont le potentiel lymphoïde est faible ou inexistant (Akashi et al. 2000).

Au cours du développement, les CSH s'engagent dans un processus de différenciation et de maturation par divisions cellulaires. Ceci va s'accompagner par la perte des propriétés de multipotence et d'autorenouvellement et par l'acquisition de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles spécifiques. Actuellement, un modèle de différenciation prédomine.

Ce modèle, met en évidence un progéniteur commun multipotent (multipotent progenitor (MPP)), qui donne naissance à des progéniteurs engagés dans la voie myéloïde, les progéniteurs communs myéloïdes (common myeloid progenitor [CMP]), ou dans la voie lymphoïde, les progéniteurs communs lymphoïdes (common lymphoid progenitor [CLP]) (Akashi et al. 2000; Kondo, Weissman, and Akashi 1997). Ce modèle est basé sur une séparation précoce entre lignées myéloïdes et lymphoïdes. Les CMP vont générer des progéniteurs bipotents : les progéniteurs granulo-macrophagiques (granulocyte-macrophages progenitors, GMP) et les progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (megacaryocyte-erythroid progenitors, MEP). Les CLP vont donner naissance aux précurseurs lymphoïdes B et T (*Figure 4*).

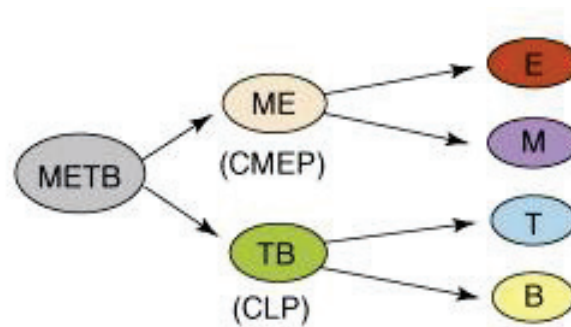


Figure 4 : Modèle classique dichotomique de l'hématopoïèse (Akashi et al, *Nature*, 2000)

Les Cellules Souches Hématopoïétiques divergent en progéniteur commun myéloïde et en progéniteur commun lymphoïde.

METB : Cellule Souche Hématopoïétique, ME (CMEP) : progéniteur commun myéloïde-érythroïde, TB (CLP) : progéniteur commun lymphoïde, E, M, T et B représentent les progéniteurs potentiels pour les cellules Erythroïdes, cellules Myéloïdes, cellules T et cellules B

Il s'agit d'un modèle classique dichotomique qui ne fait plus l'unanimité. Une hypothèse alternative a donc été proposée. Cette hypothèse serait que la CSH donnerait un progéniteur commun myéloïde (CMP) et un progéniteur commun myélo-lymphoïde (common myelo-lymphoid progenitor, CMLP) (Adolfsson et al. 2005; Katsura 2002). Le progéniteur myélo-lymphoïde générerait un progéniteur bipotentiel myélo-lymphoïde T (myelo-T progenitor, MTP) et un progéniteur myélo-lymphoïde B (myelo-B progenitor, MBP). Le potentiel myéloïde granulo-macrophagique persisterait ainsi dans les branches T et B (*Figure 5*).

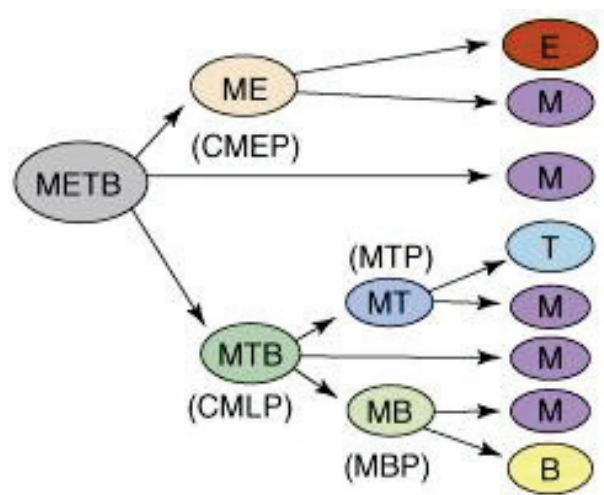


Figure 5 : Modèle de l'hématopoïèse avec une origine myéloïde (Luc, Buza-Vidas, and Jacobsen, *Seminar in Immunology*, 2008)

Les cellules Souches Hématopoïétiques génèrent des progéniteurs communs Myéloïdes-Erythroïdes et des progéniteurs communs Myéloïdes-Lymphoïdes. Le potentiel myéloïde persiste dans les cellules T et B même après que ces lignées aient divergées.

METB : Cellule Souche Hématopoïétique ; CMEP : Progéniteur Commun Myéloïde-Erythroïde ; CMLP : Progéniteur Commun Myéloïde-Lymphoïde ; MTP : Progéniteur Myéloïde des cellules T ; MBP : Progéniteur Myéloïde des cellules B ; E, M, T et B représentent les progéniteurs essentiels pour les cellules Erythroïdes, les cellules Myéloïdes, les cellules T et les cellules B.

Outre ce modèle classique, d'autres modèles de différenciation ont été proposés. Un de ces modèles est celui proposé par Abramson et al en 1977 (Abramson, Miller, and Phillips 1977) (*Figure 6a*). Il s'agit du premier modèle à montrer que les cellules myéloïdes, T et B sont dérivés d'une cellule souche (désignée comme METB). Les cellules érythroïdes n'ont pas été examinées dans leur étude, mais néanmoins une voie myéloïde-érythroïde commune a été incluse, probablement parce que les progéniteurs myélo-érythroïdes, aussi appelés cellules souches myéloïdes étaient présumés à exister. Un autre modèle est le modèle stochastique ou modèle de restriction aléatoire, postulé par l'équipe d'Ogawa en 1983 (Ogawa, Porter, and Nakahata 1983) (*Figure 6b*). Les lignées T et B n'étaient pas incluses dans l'étude originale,

mais dans cette étude, ces deux lignées sont ajoutées à titre de comparaison. Un troisième modèle, le modèle de restriction séquentielle proposé par Brown et son équipe (Brown, Bunce, and Guy 1985) émet l'hypothèse que le potentiel de développement des progéniteurs change avec la progression de la différenciation (*Figure 6c*). Un quatrième modèle proposé par Singh en 1996 (H. Singh 1996) est basé sur l'étude de facteurs de transcription dans les cellules hématopoïétiques (*Figure 6d*). Enfin, un dernier modèle, lequel correspond au modèle classique modifié, et proposé par Adolfsson (Adolfsson et al. 2005), place le progéniteur MTB entre la cellule souche hématopoïétique (METB) et le progéniteur lymphoïde commun (TB) (*Figure 6e*).

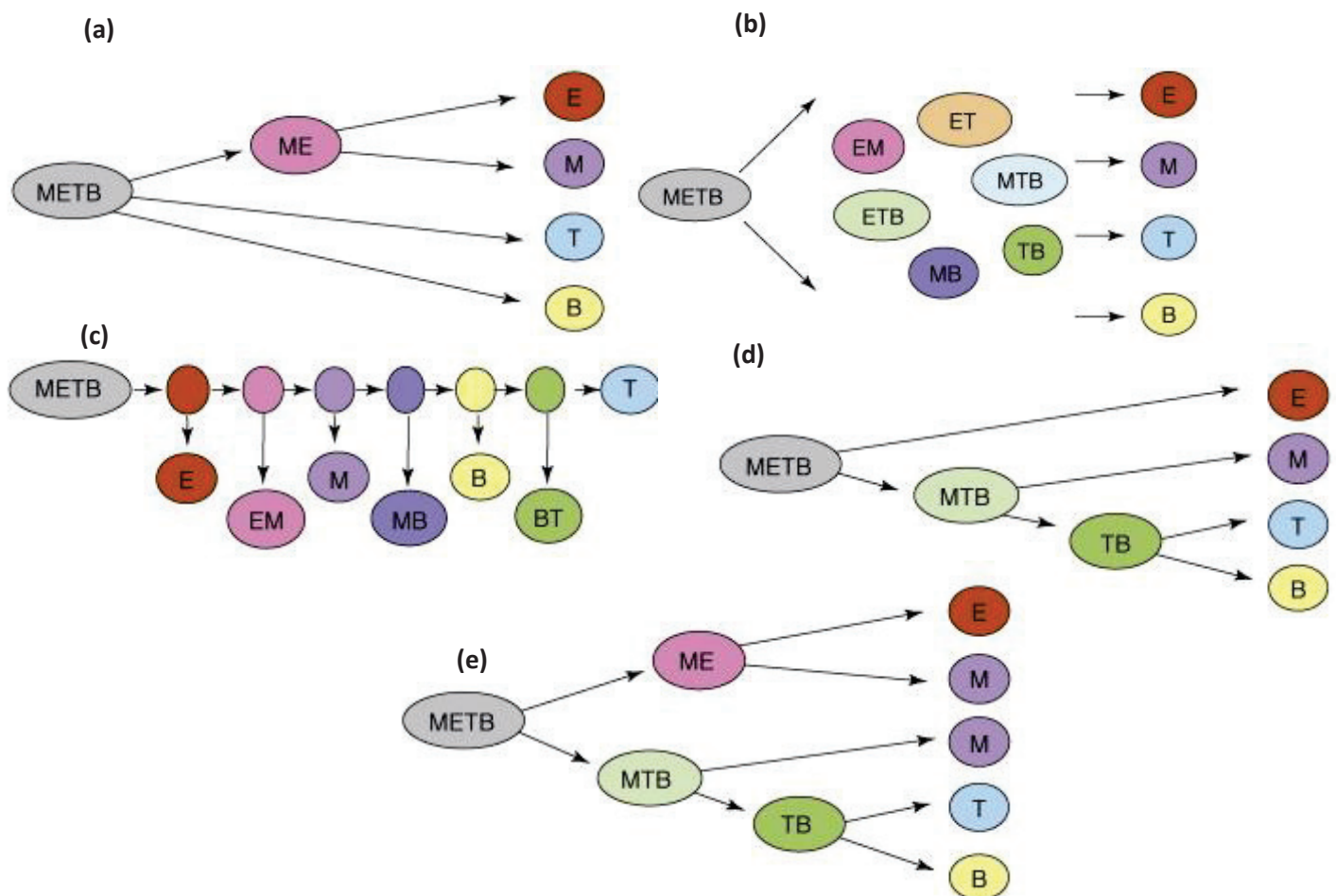


Figure 6 : Autres modèles d'hématopoïèse (Abramson et al, *The Journal of Experimental Medicine*, 1977 ; Ogawa et al, *Blood*, 1983 ; Brown et al, *British Journal of Cancer*, 1985 ; Singh et al, *Current Opinion in Immunology*, 1996, Adolfsson et al, *Cell*, 2005)

Afin de confirmer ces différents modèles de différenciation, des tests clonogéniques in vitro (culture médullaire en milieu semi-solide en présence de facteurs de croissance) ont été réalisés. Ces tests ont démontré l'existence de progéniteurs engagés

(appelés Colony-Forming-Unit ou CFU), qui n'ont pas de propriétés d'auto-renouvellement et qui génèrent des colonies contenant un ou plusieurs types cellulaires myéloïdes (T. R. Bradley and Metcalf 1966). Le progéniteur le plus précoce est le CFU-GEMM (1/10 000 cellules médullaires), générant des colonies mixtes granulo-érythro-mono-mégacaryocytaires. Ensuite arrive les BFU (Burst Forming-Unit), les CFU érythroblastiques (BFU-E et CFU-E), les CFU mégacaryocytaires (CFU-MK), les CFU éosinophiles (CFU-Eo), les CFU basophiles (CFU-B) et les CFU granulo-macrophagiques (CFU-GM) (pour la production des polynucléaires neutrophiles et monocytes), lesquels sont à l'origine des CFU granuleux (CFU-G) et des CFU mono-macrophagiques (CFU-M). Ces tests sont couramment utilisés en routine clinique comme tests fonctionnels. En 8 à 14 jours en présence de facteurs de croissance, nous pouvons observer des colonies hématopoïétiques. Au niveau immunophénotypique, ces progéniteurs sont CD34+ et portent des antigènes qui sont spécifiques du lignage auxquels ils appartiennent (*Figure 7*).

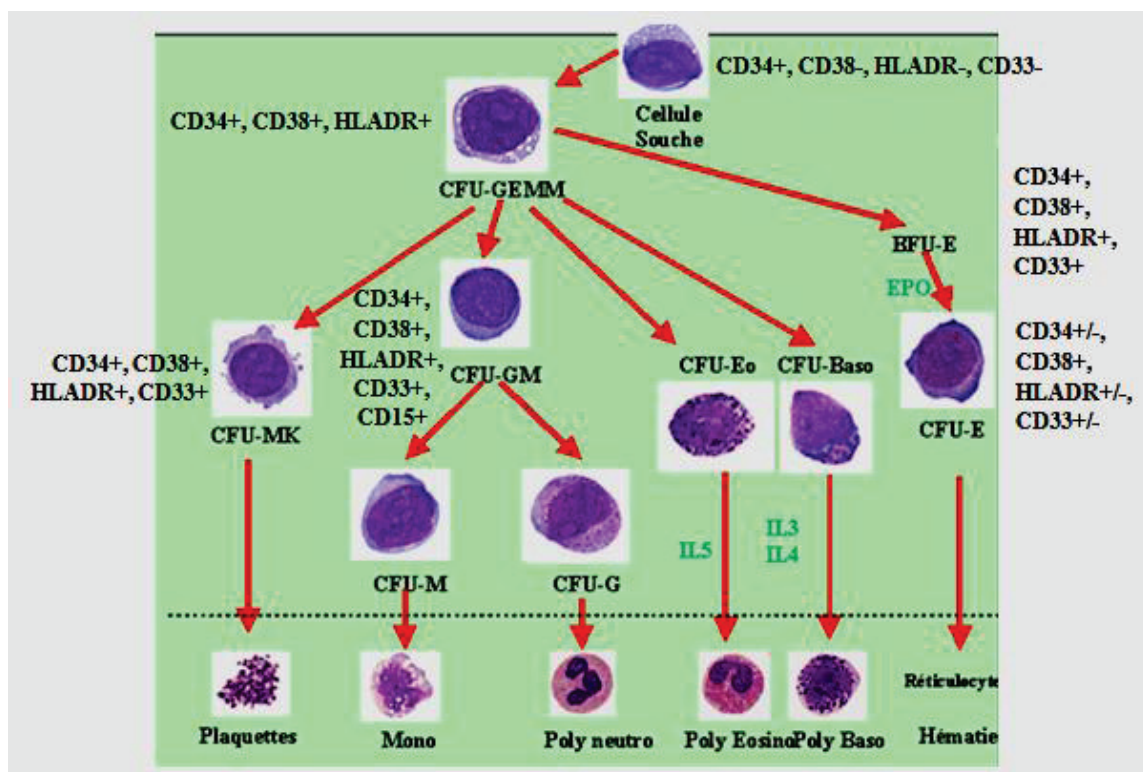


Figure 7 : Progéniteurs hématopoïétiques médullaires myéloïdes et marqueurs antigéniques (Adapté de T.R. Bradley and Metcalf, *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 1996)

CFU-GEMM: Colony Forming Unit - Granulocytes, Erythrocytes, Monocytes, Mégacaryocytes, CFU-MK: Colony Forming Unit – MegaKaryocytic, CFU-GM: Colony Forming Unit: Granulocytes, Monocytes, CFU-M: Colony Forming Unit – Monocytes, CFU-G: Colony Forming Unit – Granulocytes, CFU-Eo: Colony Forming Unit – Eosinophiles, CFU-Baso: Colony Forming Unit – Basophiles, BFU-E: Burst Forming Unit – Erythroid, CFU-E: Colony Forming Unit - Erythroid

Ces progéniteurs subissent alors une succession de divisions cellulaires et d'étapes de maturation aboutissant aux précurseurs engagés et spécifiques d'une seule lignée. Ces précurseurs sont identifiables morphologiquement par prélèvement de moelle osseuse (myélogramme ou biopsie ostéo-médullaire). On distingue ainsi, différentes voies de différenciation identifiables morphologiquement : Mégacaryopoïèse, Erythropoïèse, Monopoïèse, Granulopoïèse et Lymphopoïèse (*Figure 8*).

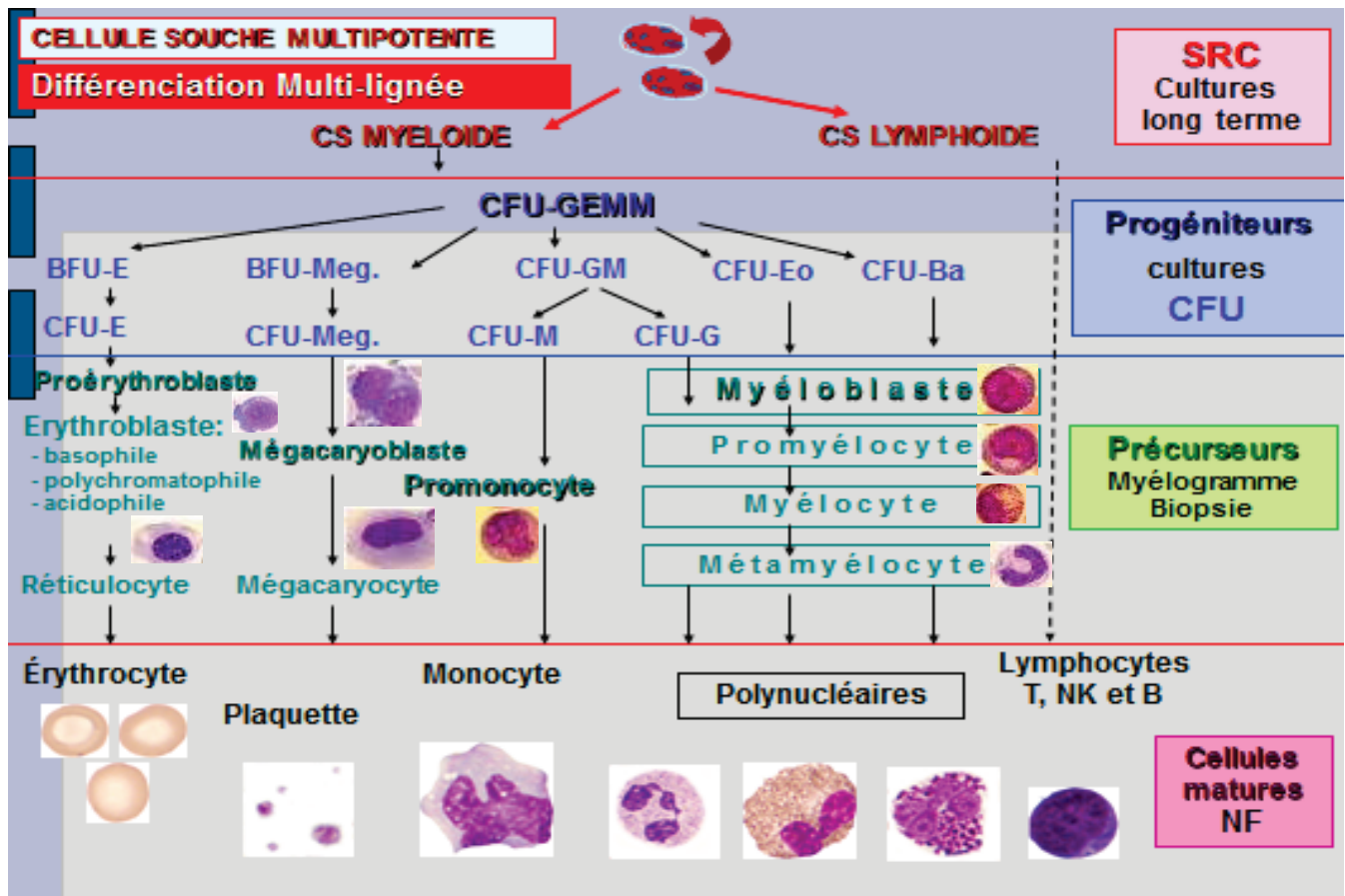


Figure 8 : Les différents compartiments de la moelle osseuse hématopoïétique (Laboratoire Hématologie-St Etienne)

CS : Cellule Souche, SRC : Short-Term Repopulating Cells, CFU: Colony Forming Unit, E: Erythroïde, Meg: Mégacaryocytaire, GM : Granulocyte-Monocyte/Macrophage, M: Monocyte, G: Granulocyte, Eo: Eosinophile, Ba: Basophile, GEMM: Granulocyte-Erythrocyte-Monocyte/Macrophage, Métamyélocyte

III- La niche hématopoïétique

L'hypothèse que la biologie des cellules souches hématopoïétiques est influencée par une niche a été proposée pour la première fois en 1978 par un hématologue anglais (Schofield 1978). Depuis, plusieurs niches ont pu être localisées chez l'adulte : dans les ovaires, les testicules, la moelle hématopoïétique, les follicules pileux, l'épithélium intestinal ou encore le système nerveux. Ces niches sont constituées de nombreuses cellules immobilisées et

localisées dans un endroit spécifique de l'organe permettant le maintien d'un stock de cellules souches. Dans cette niche, les cellules reçoivent une multitude de signaux complexes qui contrôlent leur auto-renouvellement. Malgré ces points communs, la nature des cellules participant à la niche est différente selon l'organe considéré. Et les signaux échangés ne sont probablement pas tout à fait identiques (Jones and Wagers 2008).

Après la naissance, les cellules sanguines sont produites en permanence dans la moelle osseuse. Elles sont sous le contrôle d'autres cellules dont le rôle exact n'est pas encore totalement élucidé. Il a été constaté que les cellules souches sont spécifiquement localisées à proximité de l'os (*Figure 9*), et dans cette région, se trouvent des ostéoblastes qui sont des cellules responsables de la construction des os, dont certains pourraient créer des niches pour les cellules souches (Quesnel B 2012). Ces ostéoblastes produisent des substances appelées chimokines qui agissent comme un aimant en attirant les cellules souches. Grâce à leurs molécules, dites d'adhérence, qui vont se lier à des molécules situées à la surface des cellules souches, ces dernières vont se fixer à la matrice osseuse. L'adhérence des cellules souches aux ostéoblastes et à la matrice semble capitale pour contrôler la prolifération. Afin de maintenir les propriétés d'auto-renouvellement des cellules souches, des interactions « récepteur-ligand » vont induire une augmentation de production de molécules d'adhérence et inhiber les divisions cellulaires. De plus, les ostéoblastes vont produire des facteurs impliqués dans le maintien de ces propriétés mais dont le rôle n'est pas encore élucidé.

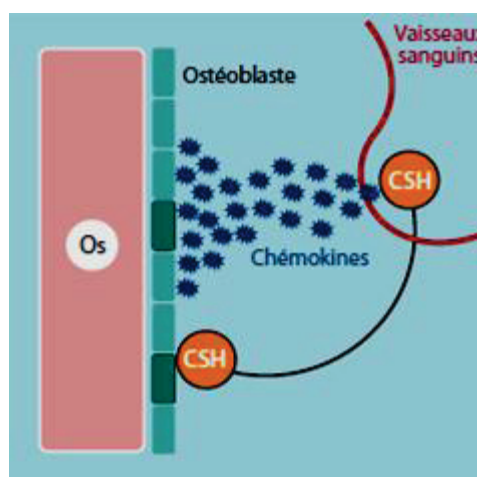


Figure 9 : La niche des Cellules Souches Hématopoïétiques (Adapté de Quesnel B, Elsevier Masson, 2012)

La niche est localisée près de l'os, où certains ostéoblastes (en vert foncé) produisent des chimokines qui attirent les Cellules Souches Hématopoïétiques et établissent, avec elles, différentes interactions

Lors de l'activation des CSH, des enzymes produites dans la zone ostéoblastique vont activer une molécule (kit-ligand) qui stimulera la prolifération des cellules souches lesquelles perdront leurs molécules d'adhérence, ce qui aura pour conséquence de les éloigner des ostéoblastes. Ces CSH vont proliférer, perdre petit à petit leurs capacités d'auto-renouvellement, se différencier et migrer vers les vaisseaux sanguins. Sur leur trajet, elles vont rencontrer une grande variété de cellules probablement impliquées dans le contrôle de tous ces phénomènes : par exemple, les cellules endothéliales qui bordent les vaisseaux sanguins contribueront à la survie des cellules en voie de différenciation, ce qui a amené à soupçonner l'existence d'une niche vasculaire (Bourke et al. 2009) (*Figure 10*).

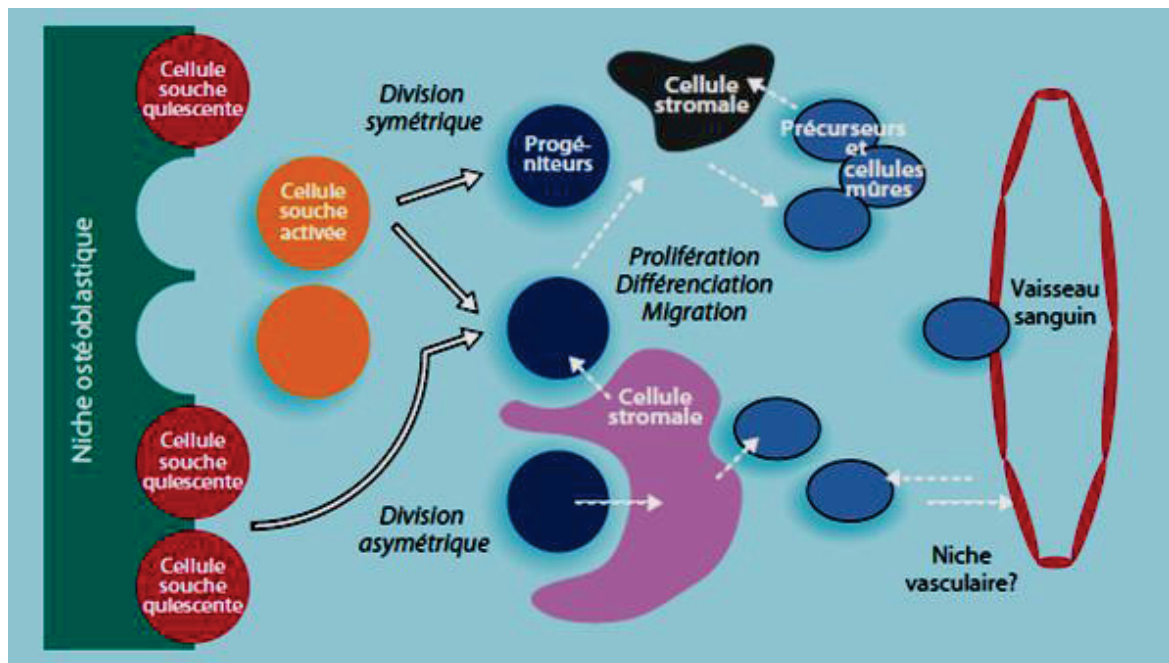


Figure 10 : Représentation de la niche vasculaire (Adapté de Bourke et al, *Blood*, 2009)

Les cellules souches quiescentes (c'est-à-dire dormantes) adhèrent à la niche. Lorsqu'elles sont activées, elles donnent naissance à des cellules souches et à des progéniteurs par division asymétrique. Plusieurs types de cellules stromales interviennent probablement dans le contrôle des progéniteurs et des précurseurs. Les cellules mûres migrent dans les vaisseaux sanguins.

Chapitre II : La Leucémogenèse

I- Le processus de Leucémogénèse

L'apparition de la leucémie serait due à des influences micro environnementales telles qu'une exposition au benzène (ex : tabagisme chronique) (Estey and Döhner 2006). Il peut y avoir une incidence élevée chez les travailleurs des industries nucléaires (mais pas des personnes habitant à proximité des usines nucléaires) et chez les pilotes d'avion qui sont exposés aux radiations cosmiques. On distingue les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) de novo des LAM qui sont secondaires soit à un traitement (agents alkylants, inhibiteurs des topoisomérases II [étoposide, doxorubicine]), soit à une hémopathie maligne chronique (Syndrome MyéloProlifératif, Syndrome MyéloDysplasique).

Ces divers facteurs vont ainsi transformer une cellule immature, cellule hématopoïétique, en cellule souche leucémique. Cette cellule souche leucémique donnera naissance à un clone leucémique par auto-renouvellement, blocage de la différenciation et prolifération anormale (Bonnet and Dick 1997; Jordan 2007; Chao et al. 2017) (*Figure 11*).

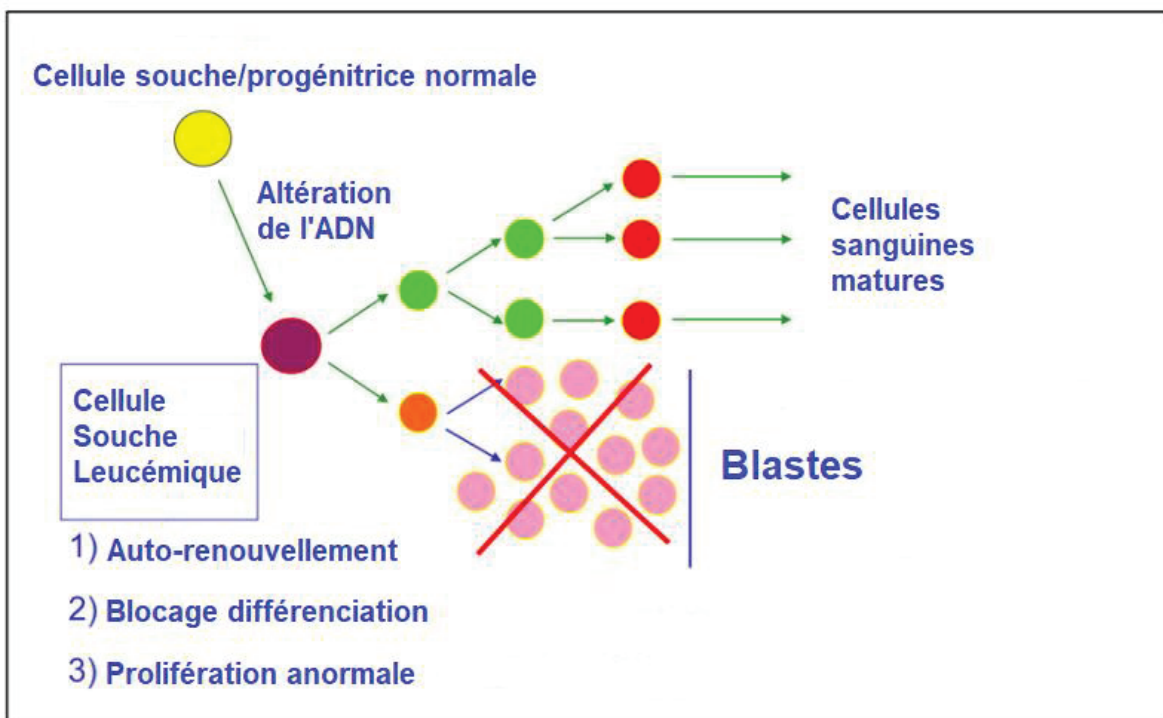


Figure 11 : Développement de la leucémie aigüe myéloïde. (Adapté de Jordan, *Best Practice & Research*, 2007)

La leucémie correspond ainsi à la transformation de progéniteurs médullaires appartenant à une lignée médullaire normale (granuleuse, lymphoïde, mégacaryocytaire, érythrocytaire) bloqués à un stade précoce de leur maturation : blastes. Cette expansion clonale de blastes myéloïdes dans le sang périphérique, la moelle osseuse (Khwaja et al. 2016) ou d'autres tissus (Campo et al 2011) va inhiber l'hématopoïèse normale (syndrome d'insuffisance médullaire : incapacité à produire des cellules sanguines en quantité suffisante pour compenser les pertes) (Khwaja et al. 2016) (*Figure 12*).

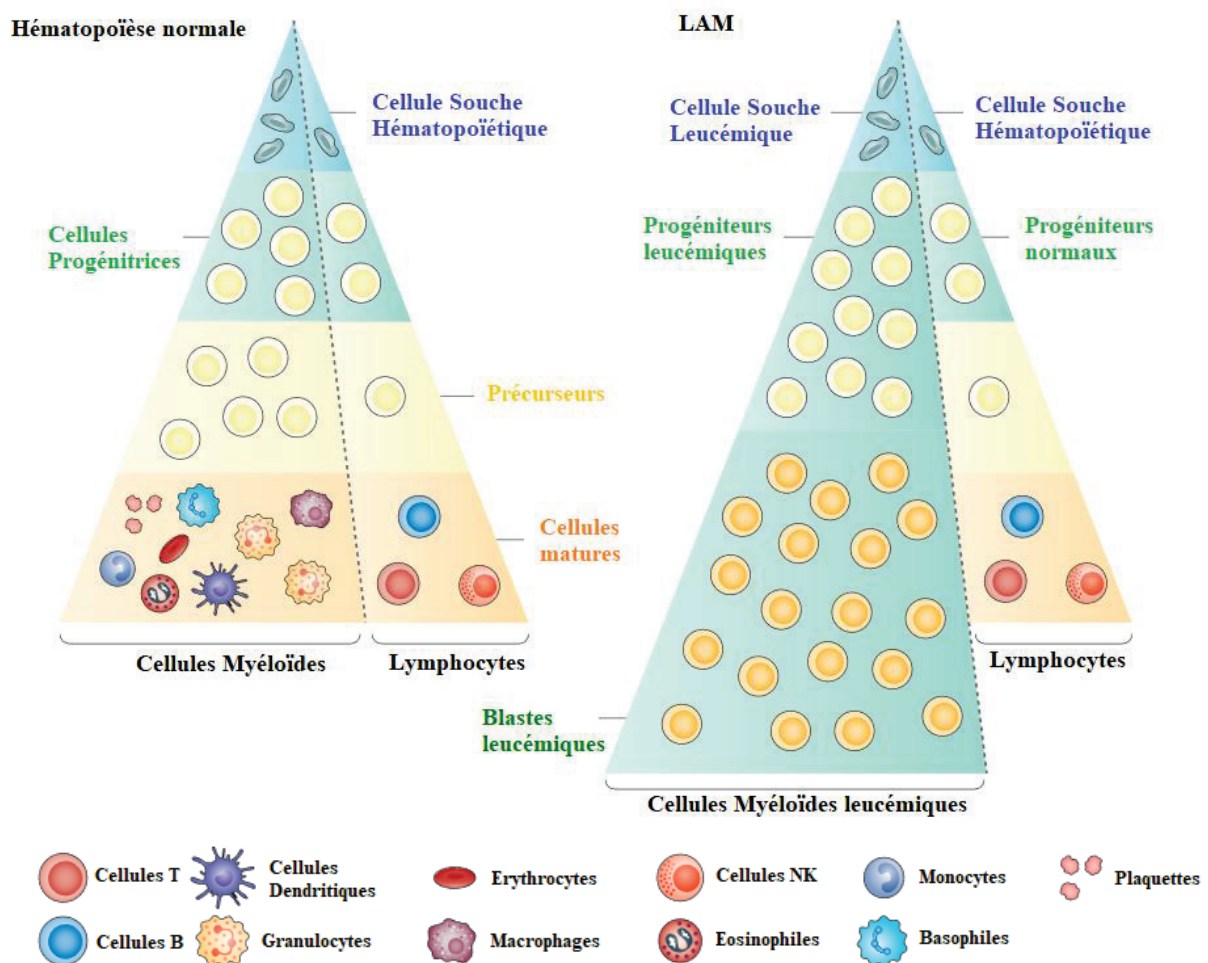


Figure 12 : Comparaison entre hématopoïèse normale et leucémique (Adapté de Khwaja et al, *Nature reviews Disease Primers*, 2016)

Les cellules leucémiques comme d'autres cellules cancéreuses sont caractérisées par des anomalies dans la prolifération, la survie et la différenciation (Stock and Thirman 2016). Ces caractéristiques cellulaires sont causées par des changements, génétiques et épigénétiques, variés au niveau des cellules tumorales. Contrairement aux tumeurs solides, il n'existe pas beaucoup de mutations au niveau des séquences codantes. Des données

expérimentales sur des modèles de souris leucémogènes montrent que plus d'une mutation coopératrice est nécessaire pour développer la LAM (Grisolano et al. 2003; Schessl et al. 2005).

Ces mutations peuvent être catégorisées en groupes fonctionnels qui affectent des activités cellulaires distinctes. Jusqu'à présent, trois grandes catégories de mutations des gènes ont été décrites (*Tableau 1*) (Network 2013) :

- **Mutations de type I** : gènes impliqués directement dans les différentes voies de signalisation entraînant une prolifération anormale et une survie tumorale (L. Grimwade et al. 2012).
- **Mutations de type II** : responsables du blocage de la différenciation, elles touchent les facteurs de transcription. Les gènes touchés donnent des protéines de fusion qui vont induire un blocage de la différenciation (L. Grimwade et al. 2012).
- **Mutations de type III** : gènes impliqués dans l'épigénétique, ils modifient l'environnement cellulaire ce qui influera sur l'expression d'autres gènes.

Catégories fonctionnelles	Caractéristiques affectées	Exemples de gènes mutés dans les LAM	Fréquence des patients LAM (%)
Voies de signalisation	Prolifération anormale et survie tumorale	FLT3, KIT, KRAS, NRAS, sérine/thréonine kinases	59
Facteurs de transcription	Blocage de la différenciation	PML-RARA, MYH11-CBFB, RUNX1-RUNX1T1, RUNX1 et CEBPA	20
Modificateurs épigénétiques	Modification de l'environnement cellulaire	DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2, fusion MLL, ASXL1, EZH2, NPM1, TP53, WT1, PHF6, SRSF2, U2AF1, STAG2, RAD21, SMC1, SMC3	45

Tableau 1 : Les trois grandes catégories de mutations des LAM (adapté de Network, *New England Journal of Medicine*, 2013)

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde ; PML : Promyelocytic leukemia ; RARA : Retinoic Acid Receptor α ; MYH11 : Myosin Heavy Chain 11 smooth muscle ; CBFB : core-binding factor subunit- β ; RUNX1 Runt-related transcription factor 1 ; RUNX1T1 : RUNX1 translocated to 1 ; CEBPA : CCAAT/enhancer-binding protein- α ; FLT3 : FMS-related tyrosine kinase 3 ; DNMT3A : DNA methyltransferase 3A ; TET2 : tet methylcytosine dioxygenase 2 ; IDH : isocitrate dehydrogenase ; MLL : myeloid/lymphoid mixed-lineage leukemia ; EZH2 : enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit ; NPM1 : nucleophosmin ; WT1 : Wilms tumour 1 ; PHF6 : PHD finger protein 6 ; SRSF2 : serine/arginine-rich splicing factor 2 ; U2AF1 : U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 ; STAG2 : stromal antigen 2 ; SMC : structural maintenance of chromosomes protein.

L'équipe de Corces-Zimmerman a pu identifier une architecture clonale caractérisée par des mutations pré-leucémiques et des mutations tardives et ainsi mettre en évidence de possibles modèles d'acquisition de mutations chez les patients atteints de LAM (Corces-Zimmerman et al. 2014). Des mutations dans les gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN, dans la modification de la chromatine et dans la topologie de la chromatine (complexe de cohésine) ont été significativement sur-représentées dans le sous-groupe des mutations pré-leucémiques et sous-représentées dans le sous-groupe des mutations tardives (*Figure 13 A*). Ainsi, de ces résultats, ils ont pu développer un modèle d'acquisition des mutations dans lequel les mutations pré-leucémiques (mutations fondatrices) se produisent dans les gènes impliqués dans la régulation globale de l'expression génique à travers des mécanismes épigénétiques, alors que les mutations tardives (mutations coopératrices) se produisent dans les gènes qui conduisent généralement à une augmentation de la signalisation activée et de la prolifération cellulaire tel que RAS et FLT3 (*Figure 13 B*).

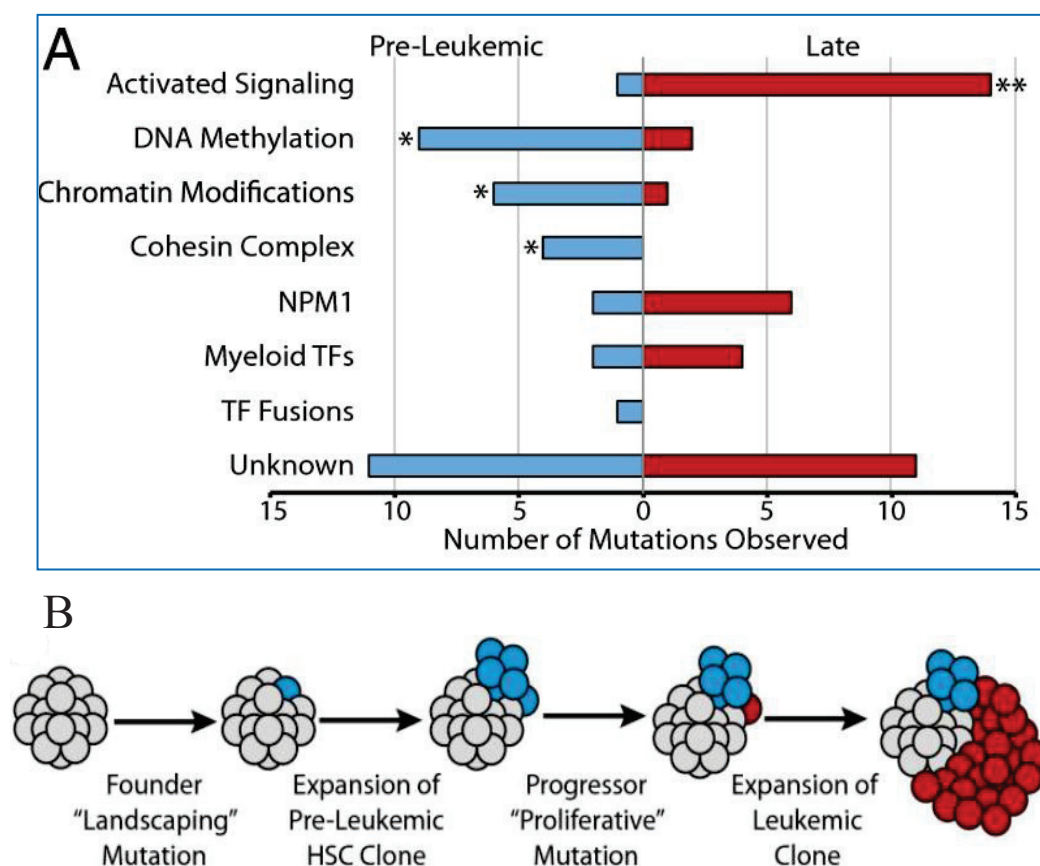


Figure 13 : Acquisition des mutations précoces et tardives dans les LAM (Corces-Zimmerman et al, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014)

A : Identification des mutations précoces et tardives ; B : Modèle d'acquisition des mutations dans la LAM

II- La cellule souche leucémique

II-1. Cellule Souche Leucémique : définition

Il s'agit d'une cellule initiatrice de cancer qui possède la propriété de se multiplier à l'identique, afin de maintenir son stock constant, et de produire des cellules leucémiques. Le pouvoir de multiplication des cellules souches leucémiques est tel que leur nombre peut rester très faible, rendant leur étude très difficile, et ceci explique que les moyens pour les étudier ne sont devenus accessibles que tout récemment. A l'heure actuelle, il n'existe pas de liste formelle de gènes ou protéines permettant de distinguer les cellules initiatrices de leucémies, des cellules souches hématopoïétiques normales. Leur caractérisation repose donc sur la mise en évidence, dans des systèmes de culture (in vivo ou in vitro) ou dans des modèles animaux (Becker, McCULLOCH, and Till 1963), de la fonction clé des cellules souches leucémiques, c'est à dire leur capacité à se multiplier et à donner des cellules leucémiques identiques à la population leucémique de départ. Ces techniques artificielles tentent de mimer la diversité des clones (ou groupes de cellules leucémiques) présents au diagnostic et permettent de démontrer quels clones, identifiés par leurs anomalies génétiques, sont (ou seraient) capables d'engendrer des leucémies. Ces études fonctionnelles sont nécessaires pour apporter un potentiel leucémogène aux anomalies génétiques observées. Cette recherche qui a débuté il y a plus d'une dizaine d'années permet maintenant d'attribuer au moment du diagnostic une valeur pronostique à la présence ou non de cellules souches leucémiques dans l'échantillon tumoral. Leur nombre et leurs caractéristiques homogènes ou non (un ou plusieurs clones) affine la définition de la leucémie. Leur suivi au cours du traitement, permettra d'identifier les clones insensibles (ou devenus insensibles) aux thérapeutiques. Du point de vue de la recherche thérapeutique, l'étude des cellules souches leucémiques permettra d'identifier des traitements ou schémas thérapeutiques permettant de les atteindre définitivement soit au moment du traitement de la leucémie soit lors de la rémission complète.

II-2. Caractéristiques phénotypiques des cellules souches leucémiques

Il existe des similitudes entre le phénotype de la cellule souche leucémique (CSL) et celui d'une cellule souche hématopoïétique : même phénotype CD34⁺CD38⁻, même capacité de différenciation, même capacité d'auto-renouvellement. C'est pourquoi il a été suggéré que la CSL pourrait provenir d'une cellule souche hématopoïétique (Bonnet and Dick 1997). Dans

la leucémie, ce dont nous identifions est une expression aberrante des marqueurs de différenciation de l'hématopoïèse normale (Moshaver et al. 2008) tel que CD123 (Hwang et al. 2012) ou l'apparition de nouveaux marqueurs, tel que CLL-1 associé à la leucémie aigüe myéloïde (Bakker et al. 2004). Deux études ont également montré que l'expression des marqueurs ALDH (Aldéhyde Déshydrogénase) et CD45RA, marqueurs très immatures, pouvait permettre de discriminer la population des cellules souches leucémiques immatures CD34⁺CD38⁻ de la population des cellules souches leucémiques matures CD34⁺CD38⁺. En effet, ces marqueur seraient fortement exprimés dans les cellules souches leucémiques immatures CD34⁺CD38⁻ (Pearce et al. 2005; Kersten et al. 2016). L'équipe de Schuurhuis a commencé par étudier l'expression de marqueurs exprimés dans des cellules CD34⁺CD38⁻ de LAM avec anomalies moléculaires spécifiques (Tableau 2) (Terwijn et al. 2014). Ils ont poursuivi ce travail avec d'autres marqueurs permettant de discriminer la cellule souche leucémique à la cellule souche hématopoïétique : CD2, CD7, CD11b, CD19, IL1RAP, TIM3, CD25, CD45RA, CD96, CD99, CD22, CD56, CLL-1 (Hanekamp, Cloos, and Schuurhuis 2017). Cette même équipe a également mis au point une nouvelle approche, par CMF, de la détection des CSL à l'aide d'un seul tube 8 couleurs comportant des marqueurs communs (CD45, CD34 et CD38), des marqueurs spécifiques (CD45RA, CD123, CD33, CD44) et un cocktail de marqueurs réunis dans un seul canal de fluorescence (CLL-1/TIM3/CD7/CD11b/CD22/CD56). Cette approche a permis de montrer que l'analyse avec un seul tube était aussi performante que l'analyse multi-tubes (Zeijlemaker et al. 2016).

LAM en fonction des anomalies moléculaires	Expression des marqueurs sur les cellules CD34 ⁺ CD38 ⁻
LAM t(8 ;21)	CD19 ⁺
LAM avec >50% de FLT3-ITD	CD33 ⁻
LAM avec mutation NPM1	CD33 ⁻ CLL-1 ⁺
LAM avec <50% de FLT3-ITD	CLL-1 ⁺ CD7 ⁺

Tableau 2: Surexpression et absence d'expression de marqueurs de surface sur les cellules souches leucémiques CD34⁺CD38⁻
(Adapté de Terwijn et al, *PloS One*, 2014)

La détection de la maladie résiduelle (MRD), dans les leucémies aiguës, est en théorie une technique particulièrement séduisante. Elle est rapportée à des sensibilités très inférieures à 1 pour 1000. Plusieurs remarques doivent être faites : tout d'abord, il s'agit d'une approche particulière, correspondant à la détection de cellules rares et justifiant une stratégie systématique de détection de combinaisons à base d'anticorps monoclonaux. Ensuite, toutes les leucémies aiguës myéloïdes ne disposent pas toujours de combinaisons de marqueurs permettant ce type d'étude. Il n'est pas évident que la combinaison antigénique ainsi définie « à la carte » définisse une population cellulaire présente à de très faible pourcentage à l'état physiologique dans l'échantillon cellulaire analysé. Enfin, différentes approches pour détecter la MRD sont mises en place (Del Principe et al. 2016) mais ne sont pas spécifiques. Ainsi, la mise en œuvre de l'évaluation de la MRD dans la pratique clinique reste un défi majeur, entravé par les différences dans les analyses et les méthodes analytiques préférées employées entre les laboratoires de routine. Bien que cela soit abordé par l'adoption de tests standardisés avec un contrôle de qualité externe, il est clair que l'hétérogénéité moléculaire de la LAM associée à son architecture clonale exige que l'approche de la détection de la MRD dans cette maladie reste difficile (D. Grimwade and Freeman 2014).

Une meilleure caractérisation et identification de la cellule souche leucémique permettrait de pouvoir mieux analyser la maladie résiduelle et ainsi de pouvoir utiliser un traitement plus spécifique et plus performant pour les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde. C'est pourquoi, une grande partie du sujet de ma thèse correspond à l'identification de nouveaux marqueurs permettant l'identification des cellules souches leucémiques.

II-3. Comparaison entre cellules souches hématopoïétiques et leucémiques

D'après l'étude réalisée par l'équipe de Terwijn (Terwijn et al. 2014), la différence entre les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches leucémiques est basée sur l'expression de marqueurs aberrants et sur l'expression des propriétés taille/structure. En effet, en l'absence d'expression de marqueurs aberrants, la taille/structure (FSC/SSC) pourrait être utilisée pour différencier les cellules souches hématopoïétiques des cellules souches leucémiques. Ainsi, ils ont pu montrer que la cellule souche leucémique était identifiée comme $CD34^+CD38^-CD19^+CD45^{dim}FSC/SSC^{high}$ et que la cellule souche hématopoïétique était identifiée comme $CD34^+CD38^-CD19^-CD45FSC/SSC^{low}$ (*Figure 14*).

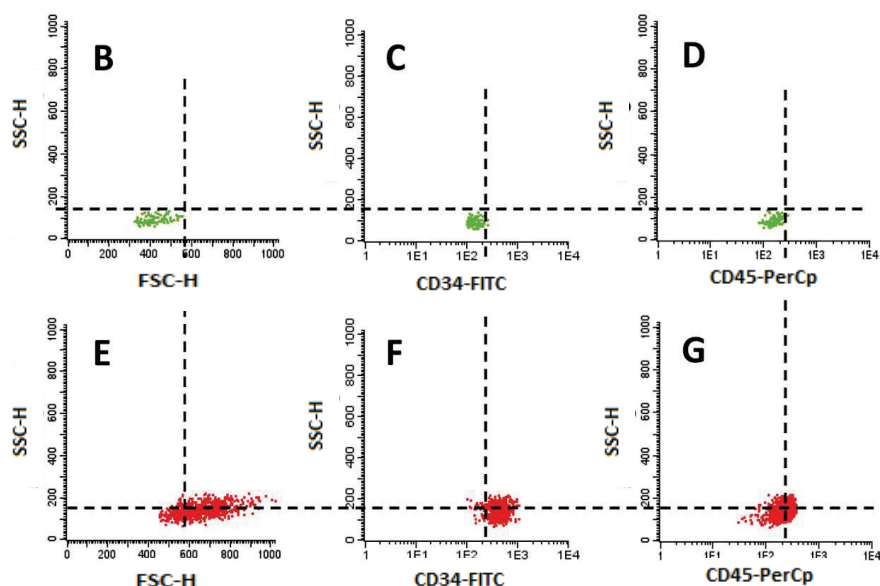


Figure 14 : Différence d'expression entre cellule souche hématopoïétique (vert) et cellule souche leucémique (rouge) (Terwijn et al, *PloS One*, 2014)

En 2017, l'équipe d'Hanekamp a montré la différence d'expression de plusieurs marqueurs entre les cellules souches hématopoïétiques et leucémiques. Ainsi, ils ont démontré la présence, sur les cellules souches leucémiques, des marqueurs CD2, CD7, CD11b, CD19, IL1RAP, TIM3, CD25, CD45RA, CD96, CD99, CD22, CD56, CLL-1 et l'absence des marqueurs CD13 et HLADR. De plus, ils ont observé une surexpression des marqueurs CD33, CD44, CD47, CD123 dans les cellules souches leucémiques par rapport aux cellules souches hématopoïétiques (Hanekamp, Cloos, and Schuurhuis 2017) (*Tableau 3*).

Marker	Identified as	Expression			
		Normal	In AML (%)	HSC	CD34 ⁺ CD38 ⁻ LSC
IL1RAP	IL1R3	T cells	79	-	+
CLL-1	CLEC12A, MICL, DCAL-2	Myeloid cells	70	-	+
TIM-3	T-cell Ig Mucin 3	Activated T cells, NK cells	91	-	+
CD2	SRBC, LFA2, T11	T cells, NK cells	87	-	+
CD7	GP40, TP41, LEU-9	T cells	43	-	+
CD11b	Integrin alpha M, Mac-1	Myeloid cells	55	-	+
CD22	BL-CAM, Siglec-2	B cells	51	-	+
CD25	IL2RA, TAC	Activated B and T cells	25	-	+
CD33	P67, Siglec-3	Myeloid cells, NK cells	82	+	++
CD44	Adhesion molecule	Ubiquitously	100	+	++
CD45RA	Tyrosine phosphatase receptor type C	T cells, myeloid cells	65	-	+
CD47	Integrin-associated protein (IAP)	Ubiquitously	100	+	++
CD56	N-CAM, MSK39	NK cells, activated T cells	32	-	+
CD96	TACTILE	Activated T cells	33	-	+
CD99	MIC2, single-chain type-1 glycoprotein	Myeloid cells	83	-	+
CD123	IL3R	Myeloid cells	82	+	++

Tableau 3 : Expression, surexpression et absence d'expression de marqueurs de surface sur les cellules souches leucémiques CD34⁺CD38⁻ (Hanekamp et al, *International Journal of Hematology*, 2017)

III- La Leucémie Aiguë Myéloïde

III-1. Epidémiologie et physiopathologie

La Leucémie Aiguë Myéloïde représente environ 3000 nouveaux cas par an en France avec une incidence de 4 à 5 nouveaux cas/100 000 habitants/an. Le décès correspond à la conséquence de l'insuffisance médullaire : en premier lieu l'infection puis les hémorragies (tous les patients seront décédés en moins d'un an sans traitement). Cette inhibition médullaire est liée à la sécrétion de chimiokines inhibitrices par les blastes leucémiques (Estey and Döhner 2006).

III-2. Classification OMS

La classification des leucémies aiguës repose avant tout sur l'analyse morphologique et cytochimique et elle est souvent confortée par l'analyse cytogénétique. Cependant, la technique d'immunophénotypage s'est beaucoup imposée dans le diagnostic des leucémies aiguës. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a édité en 2001 une classification à but pronostique des LAM (Harris et al 2001) et l'a révisée en 2008 (Vardiman et al 2009). Des modifications sensibles sont ainsi apparues : le premier élément a été l'abaissement du seuil de blastes à 20% ce qui a permis d'intégrer certains syndromes myélodysplasiques particulièrement évolutifs. Le second a été la définition de quatre entités caractérisées par les anomalies cytogénétiques et moléculaires : translocation t(15;17)/PML-RAR α , translocation t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1, inversion du chromosome 16 ou translocation t(16;16)/CBF β -MYH11 et anomalie du 11q23. Un troisième élément a été la prise en compte du caractère secondaire à un traitement de la prolifération en raison de leurs circonstances de survenue et de leur pronostic particulièrement péjoratif. Le quatrième nouveau critère est la prise en compte de la notion d'anomalies cytologiques multiples ou dysmyélopoïèse. Cette classification de 2008 comporte ainsi 7 classes : LAM avec anomalies génétiques récurrentes (translocations équilibrées, inversions, mutations), LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies, LAM thérapie-induite, LAM sans spécifications particulières (les rubriques de cette classe reprennent les critères morphologiques utilisés dans la classification FAB), sarcome granulocyttaire (forme pseudo-tumorale de LAM qui ne sera pas traitée au cours de ce travail), prolifération myéloïdes associées à la trisomie 21 (réaction leucémoïde transitoire, non traitées dans ce travail et leucémies vraies) et tumeurs blastiques plasmocytoïdes dendritiques (forme rare et de diagnostic difficile, non traitée dans notre étude).

Récemment, en 2016 (Arber et al. 2016), l’OMS a décidé de réviser la classification de 2008 et ainsi d’intégrer des informations récentes concernant la clinique, le pronostic, la morphologie, l’immunophénotypage, la génétique et la biologie moléculaire qui sont apparues depuis cette date (*Tableau 4*).

LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes		LAM sans autre spécification par ailleurs
LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; RUNX1 - RUNX1T1		LA Myéloblastique avec différenciation minimale
LA promyélocytaire avec PML - RARA		LA Myéloblastique sans maturation
LAM avec inv(16) (p13.1;q22) ou t(16;16) (p13.1;q22) ; CBFB - MYH11		LA Myéloblastique avec maturation
LAM avec t(9;11) (p22;q23) ; MLLT3 - KMT2A (MLL)		LA myélomonocytaire
LAM avec t(6;9) (p23;q34) ; DEK - NUP214		LA monoblastique / monocyttaire
LAM avec inv(3) (q21;q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2) ; GATA2, MECOM		LA érythroïde pure
LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22) (p13;q13) ; RBM15 - MKL1		LA mégacaryoblastique
LAM avec mutation NPM1		LA Myéloblastique à composante basophile
LAM avec mutation bi allélique CEBPA		LA avec myélofibrose (panmyélose aiguë)
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies		Proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle
Soit faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique		Réaction leucémoïde transitoire
Soit avec anomalie(s) cytogénétique(s) de syndrome myélodysplasique		LAM associée à la trisomie 21 constitutionnelle
Sarcome granulocytaire		Néoplasies myéloïdes post chimiothérapie
sarcomes myéloïdes de novo sans évidence de maladie médullaire		Correspondent soit à une LAM-t soit à un SMD-t

Tableau 4 : Classification OMS 2016 (Adapté de George and Czuchlewski, *The Hematologist*, 2016)

III-3. Diagnostic et suivi phénotypique des hémopathies malignes

Le diagnostic des hémopathies malignes repose sur le recueil d'un ensemble d'éléments biologiques dont l'analyse morphologique, l'analyse cytogénétique, l'analyse moléculaire et l'analyse phénotypique. Elles sont toutes complémentaires et doivent s'intégrer dans une démarche non systématique et raisonnée dans le cadre d'une collaboration entre les différents acteurs au laboratoire, collaborant à la construction médicale d'un diagnostic. L'utilisation de la cytométrie en flux permet, quand les cellules sont dissociées, ce qui est la règle générale dans les hémopathies, d'effectuer une analyse des protéines membranaires mais aussi intracytoplasmiques. Il est possible de tester en général un plus grand nombre d'antigènes en multimarquages. Ainsi, il est possible de déterminer des sous-populations cellulaires minoritaires, dont le caractère anormal ne peut provenir que de l'expression concomitante de deux marqueurs, qui, pris séparément, ne sont pas obligatoirement anormaux. Cette technique qui s'est imposée dans le diagnostic des leucémies aiguës, voit son intérêt croître aujourd'hui, dans le cadre des lymphopathies qui sont de plus en plus fréquentes et dont les classifications intègrent maintenant l'immunophénotypage.

La définition de la lignée atteinte (lymphoïde B, lymphoïde T ou myéloïde) qui est particulièrement importante pour les leucémies aiguës lymphoblastiques, est définie au mieux par le système de score du groupe français du GEIL (Groupe pour l'étude immunologique des leucémies) ou dans la classification européenne de l'EGIL (European group for the immunologic classification of leukaemia) (Bene et al. 1995). Une assignation à une lignée nécessite un score supérieur à 2 pour la lignée myéloïde et à 1 pour la lignée lymphoïde. Il permet en particulier de caractériser les leucémies aiguës avec une origine ambiguë, c'est-à-dire les leucémies aiguës bi-phénotypiques ou les leucémies aiguës indifférenciées. La caractérisation du type de leucémie aiguë est parfois possible. Ainsi, la leucémie aiguë myéloblastique avec translocation t(8;21) peut être évoquée devant un cas de leucémie aiguë myéloïde par l'expression particulièrement intense, au niveau des blastes myéloïdes, du marqueur CD34, la coexpression du marqueur pan-B CD19 et parfois l'expression du marqueur CD56. La confirmation sera ainsi obtenue en cytogénétique traditionnelle, par technique FISH ou encore en biologie moléculaire par la mise en évidence du réarrangement ETO-AML1. La caractérisation d'un facteur pronostique est également possible : c'est le cas par exemple de l'expression du marqueur d'immaturité CD34 qui est, dans la majorité des cas, corrélé à un plus mauvais pronostic dans les leucémies aiguës myéloïdes. Le caractère tumoral d'une prolifération cellulaire leucémique peut être affirmé avec la détection de trous

phénotypiques ou de phénotypes aberrants. Nous pouvons citer ainsi en exemple l'expression du CD34 sur des cellules circulantes, la co-expression de CD7 sur des cellules myéloïdes caractéristiques fréquentes des blastes de leucémies aiguës myéloïdes. La difficulté, au sein d'un échantillon pour caractériser les blastes leucémiques, est de pouvoir les isoler au sein des autres cellules pour pouvoir les étudier. Un consensus est quasiment obtenu actuellement par les équipes réalisant ce type de phénotypage en utilisant le marqueur « CD45 faible ». Il s'agit d'un marqueur panleucocytaire (antigène leucocytaire commun) qui est très utilisé par les anatomopathologistes. Nous pouvons, sur ce seul critère, isoler les blastes des autres cellules leucocytaires (monocytes, lymphocytes, granulocytes, érythroblastes). Ces blastes seront marqués avec d'autres anticorps monoclonaux couplés à d'autres fluorochromes dans des tests en quatre, six, huit ou douze couleurs. La tendance est donc à l'inclusion d'anticorps monoclonaux couplés à CD45 dans la majorité des combinaisons testées. A l'aide de ces combinaisons, un diagnostic ou une rechute de LAM peuvent être établis (M.-C. Béné and Lacombe 2015; Döhner et al. 2017; Vardiman et al. 2009) (*Tableau 5*).

Diagnostic de LAM	Marqueurs de surface et cytoplasmiques
Précurseurs	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Marqueurs granulocytaires	CD65, cMPO
Marqueurs Monocytaires	CD14, CD36, CD64
Marqueurs Mégacaryocytaires	CD41 (Glycoprotéine IIb/IIIa), CD61 (Glycoprotéine IIIa)
Marqueurs Erythrocytaires	CD235a (glycophorine A), CD36
Diagnostic de Leucémie Aiguë de Phénotype Mixte	Marqueurs de surface et cytoplasmiques
Lignée Myéloïde	MPO, au moins 2 marqueurs de différenciation monocyttaire : CD11c, CD14, CD64, lysozyme
Lignée T	CD3, cCD3
Lignée B	CD19, cCD79a, cCD22, CD10

Tableau 5 : Expression des marqueurs de surface et cytoplasmiques pour le diagnostic de LAM et LA à phénotype mixte (Adapté de Vardiman et al, *Blood*, 2009)

III-4. Traitements de la leucémie aiguë myéloïde

Naturellement, cette prolifération incontrôlée aux dépens de l'hématopoïèse met rapidement en jeu le pronostic vital par l'insuffisance médullaire et les cytopénies qui en découlent. Dès lors, on comprend qu'une prise en charge rapide et efficace soit nécessaire. Le traitement comporte deux volets.

D'une part, les soins de support symptomatiques permettent au patient de tolérer à court terme les effets indésirables de la maladie et du traitement. Les transfusions de culots globulaires et de concentrés plaquettaires permettent de pallier respectivement à l'anémie et à la thrombopénie. Les antibiotiques, et autres médicaments anti-infectieux permettent de lutter contre les infections fréquentes chez ces patients leucopéniques. Les antalgiques et anti-émétiques permettent un meilleur confort du patient.

D'autre part le traitement spécifique est représenté par une polychimiothérapie intensive à base d'agents intercalants de l'ADN (Anthracyclines et apparentés, Amsacrine), d'analogue des bases puriques (cytarabine), d'inhibiteurs de topoisomérase (Amsacrine, Etoposide) et d'antimétabolites (L-Asparaginase, Méthothrexate, Clofarabine) (Delaunay et al 2011). Les patients aux pathologies les plus graves et aptes à supporter cette procédure lourde peuvent bénéficier d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques. La Leucémie Aiguë Promyélocytaire (sous-type de LAM à bon pronostic) bénéficie de protocoles spécifiques qui sont organisés autour de l'acide tout-*trans* rétinolique qui permet une maturation des promélocytes anormaux transformant ainsi radicalement le pronostic de cette pathologie (Pigneux et al 2015). Les patients dont l'état général ne permet pas de supporter la polychimiothérapie intensive peuvent bénéficier de traitements alternatifs. On peut alors leur proposer un traitement à base de cytarabine en faible dose ou bien d'un agent déméthylant, la 5-azacytidine.

Enfin, dans certains cas, on n'instaure pas une polychimiothérapie d'emblée. En général, il s'agit de patients qui présentent une très grande leucocytose qui fait craindre un syndrome de lyse : troubles métaboliques brutaux (hyperkaliémie, hyperphosphatémie, hyperuricémie, hypocalcémie, insuffisance rénale aiguë) entraînés par la lyse simultanée de nombreuses cellules libérant leur contenu cytoplasmique. On peut alors commencer par réduire la masse tumorale grâce à de l'hydroxyurée.

Ces traitements sont pourvoyeurs d'effets secondaires graves parfois létaux, pourtant on obtient une rémission complète chez 70 à 80% des patients (Büchner et al. 2012). Se pose alors le problème de l'évaluation du pronostic pour ne réserver les moyens les plus lourds qu'aux pathologies les plus graves.

La LAM est de manière prédominante une maladie des sujets âgés. Plus de 50% des patients ayant une LAM ont plus de 60 ans et plus d'un tiers ont plus de 70 ans (Brincker H 1985; Cartwright and Staines 1992). Cependant, l'usage des traitements intensifs chez le sujet âgé est discuté pour deux raisons. La première est que certaines procédures d'intensification thérapeutique utilisées pour maintenir la rémission complète, telles que l'allogreffe de moelle osseuse ou l'autogreffe de moelle osseuse ou de progéniteurs du sang périphérique, ne peuvent être employées au-delà de 50-60 ans, car trop toxiques. La seconde raison, plus immédiate, est que le traitement d'induction conventionnel ne permet d'obtenir une rémission complète que dans seulement 50% des cas au-delà de 65ans. Les échecs sont liés avant tout à une mortalité importante au cours de la phase d'aplasie chimio-induite (environ 30% de mortalité, dont 2/3 sont d'origine infectieuse) (Tilly et al. 1990; Dombret et al. 1995).

Chapitre III : Les Antigènes Embryonnaires

I- Origine et rôle des marqueurs embryonnaires

I-1. Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules souches pluripotentes retrouvées dans un embryon durant le stade blastocyste. Elles ont été mises en évidence pour la première fois en 1981 chez la souris, grâce aux travaux d'Evans, Kaufman et Martin (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Par la suite, ces cellules souches ont été découvertes chez l'homme en 1998 et 2000 par Thomson et Reubinoff (Thomson et al. 1998; Reubinoff et al. 2000). Ainsi, depuis 1981, il est possible d'isoler et de cultiver ces cellules souches embryonnaires in vitro et de les faire proliférer indéfiniment tout en maintenant leur capacité de pluripotence. Elles ont la particularité, en modifiant les conditions de culture, de pouvoir se différencier en n'importe quel tissu de l'organisme. Ce sont ces propriétés particulières qui intéressent les scientifiques car avec elles ils espèrent reconstituer des tissus ou des organes défaillants (Tondeur et al. 2008) et ainsi soigner certaines pathologies ou repousser davantage les limites de la vie. Mais le principe soulève des problèmes éthiques.

D'une part, le prélèvement de ces cellules souches entraîne la destruction de l'embryon, ce qui pose des problèmes vis-à-vis de l'éthique. L'utilisation de ces cellules s'en trouve donc très réglementée. Cependant, une technique permettant la dérivation de cellules souches embryonnaires à partir d'un blastomère unique prélevé sur un embryon de 8 cellules a été décrite (Klimanskaya et al. 2006, 2007). Par cette approche, on peut théoriquement dériver des cellules souches embryonnaires sans destruction de l'embryon, contournant ainsi en partie les problèmes éthiques posés par les méthodes dites « destructrices ».

En France, la recherche sur les cellules souches embryonnaires a débuté en 2004 suite à la loi de bioéthique qui a permis aux chercheurs de travailler sur des lignées importées. Depuis 2006, une révision de cette loi va autoriser deux équipes à travailler sur la dérivation de nouvelles lignées de cellules souches embryonnaires, encadrées par l'Agence de la biomédecine : l'équipe de l'Institut de Recherche en Biothérapie du CHU de Montpellier (John de Vos et Samir Hamamah) et l'équipe de l'université Paris XI (Anne Lise Bennaceur et René Frydman).

D'autre part, il faut prendre le temps de maîtriser les techniques. Pour la dérivation des cellules souches embryonnaires, les techniques utilisées sont l'immunochirurgie, qui consiste par une lyse à séparer la masse cellulaire interne de la couche externe trophoblastique, et la

séparation mécanique (Strelchenko et al. 2004). Une fois isolée, la masse cellulaire interne est mise en culture dans un milieu contenant du sérum et des facteurs de croissance, sur une couche de cellules nourricières ou en condition sans cellules de soutien. Ainsi, la réussite de la dérivation des lignées de cellules souches embryonnaires dépend de plusieurs paramètres : la qualité initiale des blastocystes, l'expérience des manipulateurs (utilisation de 10, pour les plus expérimentés, à 30 embryons mis en culture, pour les moins expérimentés) et les conditions d'isolement des cellules.

I-2. Cellules iPS

Le modèle de cellule souche embryonnaire est à la base d'un nouveau modèle de cellules pluripotentes : les cellules souches pluripotentes induites (induced pluripotent stem-cells, iPS). Il est maintenant possible de reprogrammer des cellules différenciées adultes en cellules pluripotentes qui ont les mêmes caractéristiques que les cellules souches embryonnaires en surexprimant seulement quatre facteurs de transcription (Takahashi et al. 2007), voire moins (J. B. Kim et al. 2009). Un grand enthousiasme entoure ce nouveau domaine de recherche. L'étude des iPS permet de s'affranchir de l'encadrement très strict entourant la recherche sur les cellules souches embryonnaires et les problèmes éthiques inhérents (De Vos et al. 2009).

La différenciation cellulaire a longtemps été considérée comme un processus permanent. C'est-à-dire qu'une fois qu'une cellule souche s'est différenciée en une cellule spécialisée, on pouvait penser que la cellule spécialisée était immobilisée dans cet état différencié particulier. De cette façon, les types de cellules spécialisées ont été décrits comme étant de « différenciation terminale » ou, en d'autres mots, les cellules spécialisées sont incapables de devenir d'autres types de cellules. Le groupe de Yamanaka s'est interrogé sur cette idée de « différenciation terminale ». En effet, en 2006, ils ont montré que les cellules différenciées de la peau pourraient être reconverties à un état semblable à des cellules embryonnaires pluripotentes, qu'ils ont nommé cellules souches pluripotentes induites (iPS), à l'aide de manipulation génétique des cellules de la peau en laboratoire. Depuis la découverte initiale en 2006, divers types de cellules somatiques de souris et humains ont été reprogrammés avec succès en iPS, démontrant que bon nombre de types de cellules différenciées maintiennent le potentiel d'être reconverties en cellules souches pluripotentes non spécialisées (Takahashi and Yamanaka 2006). La reprogrammation des cellules différenciées en iPS se fait grâce à la surexpression des facteurs de Yamanaka, qui sont les

quatre facteurs de transcriptions, OCT4, SOX2, Klf4 et c-Myc. Ces facteurs sont exprimés naturellement dans les cellules souches embryonnaires et ne sont pas exprimés dans des cellules différenciées, comme des cellules de la peau.

I-3. Propriétés des cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires se distinguent des autres types cellulaires en répondant à trois critères. Le premier critère est l'auto-renouvellement qui est la capacité à proliférer indéfiniment à l'état indifférencié sans altération du phénotype ni du caryotype et tout en conservant la propriété de pluripotence. Le second critère correspond à la pluripotence qui est la capacité de se différencier in vitro en de nombreux types cellulaires représentatifs des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme) et à former in vivo toutes les lignées cellulaires de l'embryon, y compris la lignée germinale, lorsqu'elles sont ré-implantées dans un embryon précoce receveur. Le troisième critère est la tumorigénicité qui est la capacité à former des tumeurs (tératocarcinomes) lorsqu'elles sont ré-implantées à l'état indifférencié dans un organisme adulte.

I-3.1 Un modèle de pluripotence

En 1984, une équipe de chercheurs a démontré pour la première fois chez la souris, la pluripotence des cellules souches embryonnaires in vivo, en réimplantant ces cellules dans la cavité d'un blastocyste hôte (A. Bradley et al. 1984). Ces cellules souches embryonnaires ainsi ré-implantées se sont intégrées dans la masse cellulaire interne de l'embryon receveur et se sont développées normalement. Elles ont participé à la formation de tous les tissus de la souris chimère née de cette expérience et ont colonisé la lignée germinale. Ceci confirme que les cellules souches embryonnaires sont bien pluripotentes et qu'elles peuvent répondre in vivo de façon appropriée aux facteurs de régulation du développement embryonnaire, aussi bien pour la prolifération, la différenciation et la migration. Elles conservent ainsi toutes les caractéristiques des cellules de la masse cellulaire interne dont elles sont issues.

En 1985, l'équipe de Doetschman décrivait pour la première fois un modèle in vitro de ce processus de développement embryonnaire, basé sur la différenciation des cellules souches embryonnaires de souris (Doetschman et al. 1985). Dans des conditions particulières de culture, il est possible d'amorcer la différenciation in vitro des cellules souches embryonnaires. Cette différenciation requiert d'une part la suppression des agents permettant leur maintien à l'état indifférencié (le LIF [Leukemia Inhibitory Factor] et/ou les MEFs

[cellules nourricières sécrétant du LIF]), et d'autre part leur culture sur des supports non adhérents. Le modèle utilisé pour différencier ces cellules souches embryonnaires s'appelle le modèle des « corps embryoïdes » et démontre que les processus précoces du développement embryonnaire peuvent être reproduits in vitro. Cette technique de formation de corps embryoïdes a depuis, été largement étudiée chez la souris par diverses méthodes (Wobus, Wallukat, and Hescheler 1991; Doetschman et al. 1985; Wiles and Keller 1991).

La pluripotence in vitro ne se limite pas à l'émergence de cellules endodermiques, mésodermiques et ectodermiques dans les corps embryoïdes. Un nombre considérable d'études a été mené chez la souris pour démontrer le potentiel de différenciation in vitro des cellules souches embryonnaires en cellules hautement spécialisées. De manière générale, trois grands types d'approches expérimentales sont utilisés pour la différenciation in vitro des cellules souches embryonnaires. La première consiste en la formation de corps embryoïdes puis en leur mise en culture en conditions adhérentes. Dans la seconde méthode, les cellules souches embryonnaires sont cultivées directement sur des cellules stromales et leur différenciation se fait directement en contact avec celles-ci (Nakano, Kodama, and Honjo 1994). Enfin, le troisième protocole implique la culture des cellules souches embryonnaires en monocouche sur une matrice extracellulaire de protéines (Nishikawa et al. 1998). Grâce à l'utilisation de ces trois méthodes et de milieux de culture adaptés, il est ainsi possible d'obtenir in vitro des cellules différenciées hautement spécialisées.

Des caractéristiques épigénétiques particulières aux cellules souches embryonnaires ont été rapportées, notamment un état de bivalence de la chromatine, se traduisant par une forte activité transcriptionnelle (Efroni et al. 2008; Meshorer et al. 2006). Les micro-ARN jouent un rôle important dans le maintien de la pluripotence ou au contraire dans l'engagement vers la différenciation (Marson et al. 2008). Tous ces domaines sont explorés actuellement de manière intense.

I-3.2 L'auto-renouvellement

Les cellules souches embryonnaires se distinguent des autres cellules par une capacité de prolifération in vitro très importante. Elles se divisent activement de façon symétrique (Zwaka and Thomson 2005) et sans se différencier. Elles peuvent donc être maintenues en culture in vitro indéfiniment et ceci tout en conservant leur propriété de pluripotence : on parle d'auto-renouvellement permanent. Les cellules souches embryonnaires s'auto-

renouvellent indéfiniment sans altération de leur phénotype ni de leur caryotype euploïde, et se distinguent ainsi des cellules tumorales d'origine cancéreuse.

I-3.3 La tumorigénicité

Les cellules souches embryonnaires présentent des propriétés de prolifération qui leur sont propres (Burdon, Smith, and Savatier 2002). Elles sont dérivées sans nécessité d'aucun agent immortalisant, elles n'entrent pas en quiescence, ne deviennent pas sénescents et peuvent proliférer sans limites apparentes. Elles peuvent également se multiplier en l'absence de sérum et ne sont pas sujettes à l'inhibition de contact. Les cellules souches embryonnaires présentent ainsi toutes les caractéristiques des cellules transformées et sont donc tumorigènes.

En effet, après injection dans des souris immuno-déficientes elles forment des tératocarcinomes composés de cellules des trois feuillets embryonnaires. Ceci est un phénomène remarquable des cellules souches embryonnaires du fait qu'elles sont génotypiquement normales et qu'elles peuvent générer des adultes sains après leur implantation dans des blastocystes. Elles se distinguent ainsi des cellules tumorales d'origine cancéreuse, qui se caractérisent par des mutations au niveau des gènes codant pour des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs.

Cette tumorigénicité des cellules souches embryonnaires est un inconvénient majeur à leur utilisation en thérapie cellulaire. En effet, une population de cellules différenciées à partir de cellules souches embryonnaires contient souvent une infime proportion de cellules toujours indifférenciées pouvant être à l'origine d'un cancer.

II- Les facteurs de transcription

Les propriétés spécifiques des cellules souches embryonnaires sont contrôlées par diverses protéines, facteurs de transcription ou voies de signalisation. Afin de mieux comprendre les caractéristiques de quiescence, de prolifération et d'auto-renouvellement de la cellule souche leucémique, nous nous sommes intéressés à plusieurs protéines et facteurs de transcription qui contrôlent ces propriétés au niveau des cellules souches embryonnaires et qui pourraient donc jouer un rôle dans la transformation leucémique. Plusieurs auteurs ont démontré qu'il y avait une surexpression de ces protéines dans des tumeurs solides, ce qui n'est pas le cas dans les tissus normaux (sein, pancréas, vessie, rein) (Schoenhals et al. 2009). Cependant très peu d'études ont étudié ces marqueurs embryonnaires au niveau des hémopathies malignes et notamment des leucémies aiguës myéloïdes. Pour ma thèse, nous nous sommes donc

intéressés à l'étude de trois facteurs de transcription qui sont OCT4, NANOG et SOX2 et à deux protéines membranaires qui sont SSEA1 et SSEA3 dont leurs propriétés de prolifération et de différenciation pourraient être modifiées suite à un événement leucémogène.

II-1. Le facteur de transcription OCT4

II-1.1 Expression du facteur OCT4 au cours du développement embryonnaire

Le facteur de transcription **OCT4** (gène *POU5F1*) est un facteur de transcription intrinsèque, c'est-à-dire constitutivement actif, qui appartient à la famille des facteurs de transcription à domaine POU pouvant se fixer sur l'ADN au niveau de séquences octamériques riches en AT (Pan et al. 2002). Chez la souris, son expression est détectée en premier dans l'ovocyte et dans l'embryon préimplantatoire jusqu'au stade morula (Pan et al. 2002), puis va se restreindre aux cellules de la masse cellulaire interne et à celles de l'ectoderme primitif de l'embryon post-implantatoire. OCT4 n'est plus exprimé dans les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme). Cependant, il est exprimé dans les cellules souches embryonnaires et son expression est maintenue dans les cellules germinales primordiales. Après différenciation, son expression diminue rapidement (Pan et al. 2002). Ce profil d'expression, spécifique des cellules totipotentes et pluripotentes, suggère que le facteur de transcription OCT4 joue un rôle important dans le maintien de la pluripotence cellulaire.

L'inactivation du gène *POU5F1* induit une létalité embryonnaire précoce : l'embryon pré-implantatoire se développe jusqu'au stade de la morula. Au-delà, il dégénère car les cellules fondatrices de la masse cellulaire interne sont incapables de s'auto-renouveler. Elles se différencient alors en trophectoderme (Rosner et al. 1990).

II-1.2 Rôle du facteur OCT4 dans l'auto-renouvellement

Pour connaître le rôle d'OCT4 dans l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires de souris in vitro, l'équipe de Niwa a construit une lignée de cellules dans laquelle le gène *POU5F1* est inactivé et remplacé par un transgène dont l'expression est activable ou réprimable par la présence ou l'absence de tétracycline dans le milieu (système d'expression conditionnelle tet-off) (H. Niwa, Miyazaki, and Smith 2000). Grâce à ce système d'expression, les auteurs ont pu montrer que l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires nécessite le maintien du niveau d'expression d'OCT4. Un manque de celui-ci

au stade blastocyste (stade de développement embryonnaire précoce des mammifères) permettrait aux cellules de la masse cellulaire interne de se différencier en cellules du trophoctoderme (cellules périphériques du blastocyste). Pour maintenir le phénotype non-différencié, l'expression d'OCT4 doit rester vers 50% de l'expression normale diploïdique. Si son expression augmente, la différenciation est lancée dans l'endoderme primitif et les cellules du mésoderme. Si son expression diminue, les cellules souches sont dédifférenciées dans les cellules du trophoctoderme (H Niwa 2001) (*Figure 15*). Ainsi, une élévation ou une baisse de ce niveau induiraient des programmes de différenciation divergents.

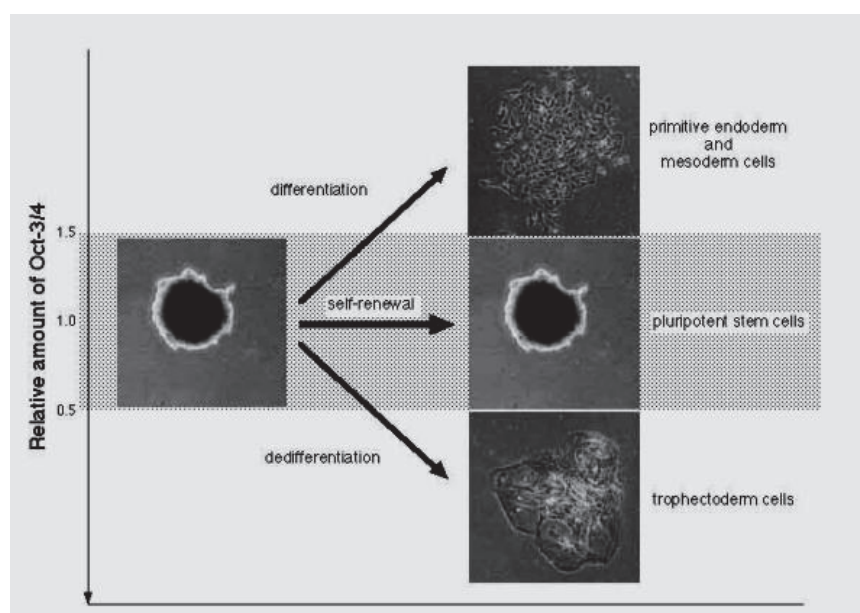


Figure 15 : Relations entre l'expression d'OCT4 et le sort des cellules souches. (Niwa, *Cell Structure and Function*, 2001)

En réalité, un niveau d'expression d'OCT4 de 50% à 150% dans les cellules souches embryonnaires est bénéfique pour l'auto-renouvellement et la maintenance de la totipotence (Pesce and Schöler 2001). OCT4 serait également à l'origine du contrôle de la pluripotence et de la quiescence des petites cellules souches embryonnaires qui sont OCT4⁺ (Dong-Myung Shin et al. 2009). En effet, la formation de cellules souches pluripotentes serait dépendante d'OCT4 (Nichols et al. 1998).

II-1.3 Profil d'expression d'OCT4 dans la tumorigénèse

A ce jour, plusieurs théories différentes sont établies pour expliquer l'origine du cancer. Selon l'hypothèse la plus récente, définie comme l'hypothèse des « cellules souches cancéreuses », ce sont les cellules souches adultes, présentes dans presque tous les tissus humains, ou les cellules somatiques reprogrammées qui seraient à l'origine du cancer (Clarke

and Becker 2006; Clarke and Fuller 2006; Reya et al. 2001). Concernant cette hypothèse, une modification dans le modèle d'expression génique des cellules souches cancéreuses entraîne une cascade de mécanismes moléculaires par lesquels les cellules deviennent agressives. L'approche des mécanismes cellulaires et moléculaires de ces voies est maintenant envisagée pour le diagnostic, le traitement et la prévention des cancers. Certains gènes embryonnaires tel qu'OCT4 sont importants dans la survie des cellules cancéreuses (Prud'homme 2012; YASUDA et al. 2011). OCT4 encode au moins trois variants différents qui sont les variants A, B et le variant B1 (plus récemment découvert). L'expression d'OCT4A est exclusive aux cellules souches (embryonnaires ou adultes), tandis que le variant OCT4B est exprimé à la fois par les cellules souches et les cellules somatiques et n'est pas impliqué dans les propriétés d'auto-renouvellement et de pluripotence des cellules souches. Finalement, de récentes publications ont montré que le variant OCT4B1 est exprimé dans les cellules souches, les lignées cellulaires cancéreuses et les tumeurs solides (J. Lee et al. 2006; Atlasi et al. 2008; Cauffman et al. 2006). Les dernières recherches ont révélé que l'expression de ce variant était élevée dans les lignées cellulaires cancéreuses et les tumeurs solides et présentait des propriétés anti-apoptotiques (Atlasi et al. 2008; Asadi et al. 2011; Farashahi Yazd et al. 2011; Gazouli et al. 2012; Papamichos et al. 2009; Ricci and Zong 2006; Mirzaei et al. 2017).

Cependant, le rôle d'OCT4 dans le développement et la progression tumorale n'a pas été totalement déterminé. Des hypothèses peuvent être formulées quant à l'action d'OCT4 sur la maladie.

II-1.4 OCT4 induirait la dérégulation d'autres protéines ou facteurs de transcription à travers différentes voies de signalisation

OCT4 agit sur trois niveaux pour maintenir l'état indifférencié des cellules souches embryonnaires et leur prolifération.

Tout d'abord, OCT4 active l'expression d'une protéine exprimée de manière inhabituelle dans des cellules souches embryonnaires : la protéine Grb2 (Gab1) qui permettra l'activation de la voie MAPK. L'activation aberrante de MAPK est un phénomène fréquent dans les LAM estimé entre 50 et 83% des cas (Milella et al. 2001; Ricciardi et al. 2005). Dans la leucémie myéloïde chronique (LMC), cette activation aberrante pourrait être liée à la surexpression de Grb2, impliquée dans des cancers (Sastry, Cao, and King 1997; Janes et al. 1994), qui activera Ras et stimulera ainsi la voie MAPK en aval conduisant à une prolifération cellulaire (Gishizky 1995).

Deuxièmement, OCT4 coopère avec le facteur de transcription CDX2 pour jouer un rôle dans la différenciation cellulaire. Des études ont précédemment montré que le gène *CDX2*, qui code pour un facteur de transcription impliqué dans le développement embryonnaire et l'homéostasie des cellules intestinales, est exprimé de façon aberrante dans presque tous les cas de LAM et favorise la leucémogénèse, alors que l'expression de *CDX2* est absente dans la tige hématopoïétique normale et cellules progénitrices (HSPC) (Scholl et al. 2007; Rawat et al. 2008). Peu de choses sont connues sur les effecteurs par lesquels *CDX2* contribue au développement de la LAM et dont la dérégulation d'OCT4 pourrait être liée.

Troisièmement, OCT4 coopère avec plusieurs voies de signalisations telles que JAK/STAT3 ou Wnt.

II-1.4.1 JAK/STAT3

La voie JAK/STAT3 induite par LIF permet d'activer les facteurs de transcription Ref1 et Utf1 "facteur de transcription cellulaire indifférencié 1" impliqué dans l'état indifférencié ou pluripotent de ces cellules. OCT4 peut représenter un régulateur critique de la capacité de pluripotence et de différenciation naïve chez l'homme : l'inhibition de *POU5F1* a considérablement supprimé le niveau d'expression et la forme phosphorylée de STAT3 soutenant l'idée que la modification de l'expression du gène OCT4 modifie les réseaux de signalisation naïfs en amont (signalisation LIF/STAT3 et ERK1/2) (Jong-Hee Lee et al. 2017). Grâce à cette voie de signalisation, OCT4 contrôle le destin cellulaire en régulant l'expression de HOXB4 (Huang et al. 2016). L'activité constitutive de JAK et STAT a été trouvée dans différents types de leucémie. La phosphorylation activant STAT3 est observée dans plusieurs lignées cellulaires et dans un grand panel de LAM (Steensma et al. 2006). Cette activation aberrante pourrait contribuer à la résistance à l'apoptose et à la prolifération accrue caractérisant la LAM, mais les mécanismes d'activation de cette voie restent à être étudiés.

II-1.4.2 Wnt

La voie Wnt régule la clairance d'une protéine cytoplasmique : la β -caténine. Elle intervient dans la cellule par l'intermédiaire de ligands qui reconnaissent la famille des récepteurs Frizzled. Leur activation entraîne une cascade conduisant à l'inhibition de la phosphorylation de la β -caténine dépendante de la GSK3 (glycogène synthase kinase) ce qui empêche sa dégradation. La β -caténine commence alors à s'accumuler et entre dans le noyau où elle joue un rôle de régulation génique activateur ou répresseur en fonction de ses

partenaires. L'inhibition pharmacologique de la GSK3 par des molécules synthétiques comme la 6 bromo-indirubine 3'oxime (BIO), active la voie Wnt en augmentant la quantité de β -caténine nucléaire permettant le maintien de l'expression du gène *POU5F1* (Sato et al. 2004).

II-1.5 Dérégulation d'OCT4 contrôlée par des mécanismes épigénétiques

Le blocage de la différenciation et la prolifération cellulaire anormale sont deux des principales causes de la leucémie et d'autres cancers. La régulation épigénétique peut être l'un des mécanismes moléculaires sous-jacents qui contrôlent la prolifération ou la différenciation cellulaire. La dérégulation d'OCT4 pourrait être évaluée par certaines voies de contrôle de l'ARNm. Certaines études ont montré que le blocage de la différenciation pourrait être lié à la sous-régulation du micro-ARN (miR) let7c dans les cellules de LAM (Pelosi et al. 2013). D'autres études ont révélé qu'elles contrôlent également la transcription de nombreux autres acteurs du réseau réglementaire de pluripotence, comprenant Lin28, cMyc, Klf4, Tcf3 ou Stat3 (Loh et al. 2006). Le traitement de let-7 est régulé négativement par lin28 (Heo et al. 2008; Visvanathan et al. 2007) et son expression est sous le contrôle de facteurs de transcription de cellules souches, comprenant OCT4 (Tiscornia and Izpisua Belmonte 2010). Ces résultats mettent en évidence la façon dont les miRs sont intrinsèquement intégrés dans le réseau moléculaire de pluripotence et sont impliqués dans des commutateurs cruciaux pour les décisions du destin cellulaire.

II-2. Le facteur de transcription NANOG

II-2.1 Fonction de NANOG

NANOG est un facteur de transcription intrinsèque, constitutivement actif, impliqué dans la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires et des cellules de la masse cellulaire interne. En effet, NANOG permet la pluripotence des cellules souches embryonnaires et empêche leur différenciation vers les lignées endodermiques extra-embryonnaires et les lignées du trophoctoderme (Hyslop et al. 2005). Il va ensuite bloquer la différenciation mésodermique des cellules souches embryonnaires, induite par la protéine morphogénique osseuse en interagissant physiquement avec SMAD1 et en interférant avec le recrutement de co-activateurs dans les complexes de transcription SMAD actifs (Oh et al. 2005). Il a aussi un rôle d'activateur ou répresseur de tumeur en se liant de façon optimale à la séquence consensus de l'ADN 5'-TAAT[GT][GT]-3' ou 5'-

[CG][GA][CG]C[GC]ATTAN[GC]-3'. Il est capable d'auto-réprimer son expression dans les cellules en différenciation, en se liant à son propre promoteur suite à l'interaction avec ZNF281/ZFP281, conduisant au recrutement du complexe NuRD et à la répression subséquente de l'expression (J. S. Kim et al. 2005). Lorsqu'elle est surexprimée, elle favorise l'entrée des cellules dans la phase S du cycle cellulaire et donc ainsi la prolifération cellulaire.

II-2.2 Identification de NANOG

Son identification a été réalisée par deux équipes. Une première équipe dirigée par Mitsui a réalisé un séquençage exhaustif des transcrits différentiellement exprimés dans les cellules souches embryonnaires et les cellules différenciées (Mitsui et al. 2003). Ils ont ainsi identifié plusieurs séquences fortement représentées dans les cellules souches embryonnaires. L'analyse fonctionnelle de ces gènes a permis d'identifier le gène NANOG dont la surexpression inhibe la différenciation des cellules souches embryonnaires de souris induite par la privation de LIF qui est une cytokine essentielle pour le maintien à l'état indifférencié. La deuxième équipe menée par Chambers a utilisé une approche de clonage fonctionnel (Chambers et al. 2003). Ils ont mis au point un système d'expression épisomal qu'ils ont utilisé pour transfecter les cellules souches embryonnaires avec une banque d'ADNc. Ils ont ensuite sélectionné les clones capables de s'auto-renouveler en l'absence de LIF. La caractérisation d'ADNc a permis d'identifier un nouveau facteur de transcription à homéodomaine appelé NANOG.

II-2.3 Expression du facteur NANOG au cours du développement embryonnaire et rôle dans l'auto-renouvellement

Au cours du développement embryonnaire, l'expression du gène *NANOG* apparaît dans les cellules internes de la morula à l'origine de la masse cellulaire interne (Chambers et al. 2003). Les transcrits NANOG sont ensuite détectés dans la masse cellulaire interne au stade blastocyste puis dans l'épiblaste lors de l'implantation. L'expression de NANOG disparaît rapidement après l'implantation. Le développement des embryons NANOG-/- s'interrompt avant l'implantation. Les cellules fondatrices de la masse cellulaire interne se différencient en endoderme pariétal et l'embryon arrête son développement (Mitsui et al. 2003).

NANOG est également exprimé dans les cellules souches embryonnaires de souris (Mitsui et al. 2003; Chambers et al. 2003). Son expression s'éteint lors de la différenciation.

L'inactivation du gène *NANOG* induit la différenciation spontanée des cellules souches embryonnaires en cellules de l'endoderme extra-embryonnaire (Mitsui et al. 2003).

Ces données mettent en évidence le rôle du gène *NANOG* dans le contrôle de l'auto-renouvellement des cellules de la masse cellulaire interne *in vivo* et des cellules souches embryonnaires *in vitro*.

II-2.4 Profil d'expression de *NANOG* dans la tumorigénèse

Le facteur de transcription *NANOG* est exprimé dans beaucoup de tumeurs solides, incluant les tumeurs du sein (Ling et al. 2012), des ovaires (Hoei-Hansen et al. 2007) et de la vessie (Zhang et al. 2012), l'adénocarcinome gastrique (Lin, Ding, and Li 2012), le mélanome (Borrull et al. 2012) et beaucoup d'autres. Une sur-régulation de l'expression de *NANOG* est responsable de la prolifération excessive, de l'invasion et de la migration dans les tissus du gliome humain. L'équipe de Niu a trouvé une connexion entre la surexpression de *NANOG* et de faibles niveaux de miR-134 dans la lignée cellulaire du glioblastome. Ces données montrent que *NANOG* est associé à une migration excessive et à la métastase des cellules cancéreuses, lequel pourrait être lié à la sous-régulation des MMPs. De plus, une surexpression de *NANOG* est corrélée à un mauvais pronostic (Niu, Yang, and Cheng 2013).

L'expression de *NANOG* est toujours corrélée à un faible pronostic tel que les tumeurs faiblement différenciées qui sont plus résistantes au traitement. Ce facteur de transcription cible plusieurs gènes associés au phénotype de malignité des cellules cancéreuses, incluant MMPs, STAT3, p53 et MRD1.

L'équipe de Siu a réalisé des essais de guérison de plaies qui ont démontré que l'inhibition de *NANOG* dans une lignée cellulaire de choriocarcinome (JEG-3) a conduit à une migration et à une invasion de cellules cancéreuses réduites. De plus, les expériences de PCR en temps réel ont révélé une expression diminuée de *NANOG* (Siu et al. 2008). L'inhibition de l'expression de *NANOG* *in vitro* conduit à une invasivité, à une prolifération cellulaire et à une migration cellulaire diminuées (Siu et al. 2008; F. Xu et al. 2012; Borrull et al. 2012; Bourillot et al. 2009). Ces données démontrent que *NANOG* est spécifiquement induit dans le processus de carcinogénèse et peut être un marqueur biologique potentiel et un marqueur pronostique pour les tumeurs malignes.

Il existe très peu d'études, à l'heure actuelle, sur la relation entre le facteur de transcription *NANOG* et les cellules souches leucémiques. Cependant, une hypothèse a été

faite sur une activation transcriptionnelle de variants protéiques. C'est-à-dire une activation de facteurs de transcription du gène NANOG2 dans les cellules leucémiques, qui pouvaient représenter « un gain de fonction » des cellules souches dans la leucémie aiguë (Eberle et al. 2010).

II-2.5 Régulation de NANOG par la voie de signalisation PI3K/AKT

L'une des cibles de la voie PI3K est la sérine/thréonine kinase AKT. La protéine AKT est impliquée dans de nombreux mécanismes tels que la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, l'adhésion, la migration, le métabolisme et la tumorigénicité dans les cellules somatiques (Yang et al. 2004). Récemment AKT a été montré comme jouant un rôle dans l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires de souris. Des cellules surexprimant une forme variante d'AKT, lui conférant ainsi une activité kinase très importante, peuvent être maintenues en auto-renouvellement et ceci même en l'absence de LIF (Watanabe et al. 2006). Ces cellules conservent par ailleurs leur propriété de pluripotence jusqu'à 11 jours sans LIF. En effet, elles ont la capacité de former des tératomes composés d'une très grande variété de cellules différenciées après injection dans des souris immunodéprimées. Ces cellules contribuent également au développement de l'embryon après transfert dans des blastocystes, elles sont donc pluripotentes.

Une étude a mis en évidence le rôle de la voie PI3K dans la régulation de l'expression du gène de pluripotence NANOG. En effet, l'inhibition de la PI3K, par utilisation de l'inhibiteur LY294002 ou par la surexpression dans les cellules souches embryonnaires du mutant $\Delta p85$, induit une diminution de l'expression de NANOG dans ces cellules. L'expression de l'autre gène de pluripotence, OCT4 ne diminue pas après inhibition de la voie PI3K. L'expression de NANOG dans les cellules souches embryonnaires semble donc être régulée en partie par la voie PI3K. Cette étude a permis de conclure que l'inhibition de la PI3K induit la différenciation des cellules souches embryonnaires. La voie PI3K permettrait ainsi le maintien en auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires en activant l'expression d'un gène majeur de la régulation de la pluripotence qui est NANOG (Storm et al. 2007).

II-3. Le facteur de transcription SOX2

II-3.1 Fonction de SOX2

SOX2 est un facteur de transcription membre de la famille SOX. Cette famille des gènes *SOX* a d'abord été définie par la découverte du facteur déterminant des testicules, Sry, chez les mammifères (Gubbay et al. 1990; Sinclair et al. 1990). Cette découverte s'est faite suite à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine dans les cellules souches embryonnaires. Les protéines de la famille SOX partagent toutes un domaine fortement lié à l'ADN hautement mobilisé (HMG). A ce jour, 20 gènes *SOX* différents ont été identifiés chez la souris et l'homme (Schepers, Teasdale, and Koopman 2002), qui sont divisés en sous-groupes, en fonction du degré d'homologie dans le domaine HMG et d'autres motifs structuraux. SOX2 est classé comme un membre du groupe SOXB1, qui comprend également SOX1 et SOX3. Bien que SOX1, SOX2 et SOX3 partagent plus de 80% de similarité de séquence et sont fonctionnellement redondants, SOX2 peut exercer des fonctions distinctes d'une manière biologiquement dépendante du contexte et est indispensable pour le développement embryonnaire. De nombreux facteurs ont été mis en évidence pour influencer la liaison des protéines SOX à leurs gènes cibles, conduisant à divers effets fonctionnels. Un tel facteur est l'interaction entre les protéines SOX et divers co-facteurs. L'interaction avec différents co-facteurs confère à SOX2 une plus grande polyvalence fonctionnelle au cours des processus de développement (Wegner 2010).

II-3.2 Expression du facteur SOX2 au cours du développement embryonnaire et rôle dans l'auto-renouvellement

Au cours du développement embryonnaire de la souris, un zygote totipotent subit un clivage pour augmenter le nombre de cellules afin de favoriser le développement d'une morula multi-cellulaire et ainsi former le blastocyste. L'expression de SOX2 est initialement détectée dans les cellules au stade de la morula, se situant plus précisément dans la masse cellulaire interne du blastocyste et de l'épiblaste (Avilion et al. 2003) au cours des derniers stades. Cela implique que SOX2 peut avoir des rôles importants dans la formation des cellules embryonnaires pluripotentes précoces. En effet, la délétion zygotique de SOX2 est embryonnairement létale en raison de l'absence de formation d'épiblaste pluripotent alors que l'absence de SOX2 a peu d'effet sur la formation de trophectoderme (Avilion et al. 2003). Par conséquent, SOX2 est un facteur essentiel dans la formation de cellules pluripotentes dans les

embryons précoces et en fin de compte un facteur critique pour le développement embryonnaire.

SOX2 est aussi important dans l'homéostasie tissulaire et la régénération tissulaire en maintenant son activité de cellule souche dans de nombreux compartiments, en particulier au niveau du système nerveux central chez les adultes (Sarkar and Hochedlinger 2013). Des cellules souches embryonnaires de génotype $SOX2^{+/-}$ peuvent être isolées à partir d'embryons hétérozygotes (Hanna et al. 2002; Avilion et al. 2003). On peut donc en conclure que le facteur de transcription SOX2 joue un rôle essentiel dans le maintien des cellules souches embryonnaires de souris en auto-renouvellement.

II-3.3 Profil d'expression de SOX2 dans la tumorigénèse

Durant ces dernières années, plusieurs études ont démontré l'impact de la dérégulation de SOX2 dans une grande variété de maladies. Une inactivation hétérozygote de SOX2 peut causer un syndrome génétique (MCOPS3) caractérisée par des difficultés de compréhension, des convulsions, des dysfonctionnements moteurs et des problèmes de croissance (Kelberman et al. 2006). A l'inverse, une sur-régulation de SOX2 est associée au développement et à la maintenance de plusieurs types de cancers (Sarkar and Hochedlinger 2013; Bass et al. 2009; Carrasco-Garcia et al. 2016; Li et al. 2012).

Les résultats d'une étude ont montré que l'inhibition de l'activité de SOX2 serait une stratégie efficace dans le glioblastome (Garros-Regulez et al. 2016). Une autre équipe a montré l'importance du facteur de transcription SOX2 dans l'initiation et la croissance des cancers cutanés ainsi que dans la régulation des cellules souches cancéreuses dans le carcinome spinocellulaire de la peau. En effet, SOX2 est absent de l'épiderme sain mais commence à être exprimé dès les stades précoces des cancers cutanés aussi bien chez la souris que chez l'homme. L'invalidation de SOX2 dans un modèle murin réduit drastiquement la formation de tumeurs de la peau, démontrant l'importance de SOX2 au cours de la tumorigénèse. Plus précisément, SOX2 marque une population de cellules souches cancéreuses ayant une plus grande capacité à former des tumeurs après transplantation. L'ablation génétique des cellules cancéreuses SOX2-positives résulte en une régression rapide des tumeurs démontrant que SOX2 marque une population de cellules qui jouent un rôle primordial dans le maintien tumoral au sein de leur environnement naturel *in vivo*. Cette étude identifie donc SOX2 comme un gène établissant un continuum au cours de la tumorigénèse

cutanée, des premières étapes de l'initiation tumorale jusqu'au contrôle des cellules souches cancéreuses dans les tumeurs invasives (Boumahdi et al. 2014).

II-3.4 Régulation de SOX2 par la voie de signalisation FGF et par la protéine Klf4

La signalisation FGF agit en synergie avec les inhibiteurs BMP par deux mécanismes. Premièrement, l'activation des MAPK par FGF induit l'inhibition du signal BMP par une phosphorylation inhibitrice sur Smad1. Cela démontre que la signalisation FGF agit en synergie avec les inhibiteurs de BMP pour induire le destin neural (Pera et al. 2003). Deuxièmement, le signal FGF active de manière spécifique le facteur de transcription Zic3, qui est nécessaire, avec Zic1, à la différenciation neurale et à l'expression du marqueur SOX2.

La protéine Klf4 est exprimée dans une variété de tissus et joue un rôle important dans plusieurs procédés physiologiques tel que la prolifération cellulaire et la différenciation terminale. Klf4 peut aussi activer ou réprimer la transcription en fonction du gène cible spécifique. Il peut agir comme oncogène ou gène suppresseur de tumeur dans certains contextes cellulaires. Dans les cellules souches embryonnaires, Klf4 agit comme un co-facteur pour SOX2 (Nakatake et al. 2006) en activant sa transcription (Hitoshi Niwa et al. 2009).

II-3.5 Relation entre NOTCH/SOX2 dans les tumeurs solides

La voie NOTCH régule le devenir cellulaire. Elle joue un rôle central dans la régulation de la maintenance des cellules souches et la différenciation (Borggreffe and Oswald 2009). De plus, la voie de signalisation NOTCH est impliquée dans la régulation de l'apoptose, la prolifération cellulaire et la différenciation (Fiúza and Arias 2007). Il a été rapporté que la voie de signalisation NOTCH a des fonctions différentes. En effet, il peut agir comme un oncogène ou avoir une fonction de suppresseur de tumeur en fonction du type cellulaire et du contexte cellulaire (Weng and Aster 2004).

Il existe peu d'études sur l'implication de NOTCH dans les tumeurs et encore moins dans les hémopathies malignes. NOTCH serait exprimé dans plusieurs tumeurs tels que le carcinome hépatocellulaire (W.-R. Wu et al. 2016) ou le cancer de la bouche (MK et al. 2016). Concernant les hémopathies malignes, l'équipe de Weng a pu montrer l'induction de NOTCH1, gène codant un récepteur transmembranaire et régulant le développement des cellules T normales, dans les Leucémies Aiguës Lymphoïdes T (Weng and Aster 2004).

D'autres études ont pu déterminer qu'il existait une relation entre SOX2 et NOTCH car une dérégulation du mécanisme NOTCH/SOX2 conduirait à la formation d'un adénocarcinome pulmonaire (X. Xu et al. 2016). De plus, de récentes études dans le cancer du poumon ont rapporté la présence d'altérations dans la voie de différenciation correspondant à NOTCH/SOX2 (Network 2013; Ferone et al. 2016). Ces données montrent le rôle de l'activation de NOTCH dans les tumeurs ou hémopathies malignes et pourraient fournir une forte justification pour les thérapies ciblées qui interfèrent avec la signalisation NOTCH.

II-4. Interaction entre les trois facteurs de transcription OCT4/NANOG/SOX2

Les facteurs de transcription OCT4, NANOG et SOX2 sont considérés comme des gènes « maîtres » conférant aux cellules souches embryonnaires leur identité. Ces facteurs ont un profil d'expression qui leur est unique et jouent un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire précoce (Avilion et al. 2003; Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003; Schöler et al. 1990; Nichols et al. 1998; Hart et al. 2004; Jeong-Heon Lee, Hart, and Skalnik 2004).

Afin de mieux comprendre le rôle de ces facteurs clés dans le maintien de la pluripotence et dans l'autorenouvellement et l'inhibition de la différenciation des cellules souches embryonnaires, deux groupes de recherche ont réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) à partir de cellules souches embryonnaires de souris et humaines (Loh et al. 2006; Boyer et al. 2005) afin d'identifier les gènes cibles de NANOG, OCT4 et SOX2.

Ces études ont montré que NANOG, OCT4 et SOX2 se fixent sur les éléments régulateurs des mêmes gènes. En effet, l'équipe de Loh a montré que, dans les cellules souches embryonnaires de souris, NANOG se fixe sur le promoteur de 44,5% des gènes cibles d'OCT4 soit 345 gènes. D'après l'étude de Boyer, dans les cellules souches embryonnaires 353 gènes possèdent des sites de fixation pour NANOG, OCT4 et SOX2. Ces observations suggèrent que les trois facteurs de transcription NANOG, OCT4 et SOX2 collaborent pour réguler des gènes cibles communs (Boyer et al. 2005; Loh et al. 2006) et forment ainsi un réseau de régulation transcriptionnelle.

Cependant, les expériences de ChIP ne permettent pas de déterminer la présence d'une régulation fonctionnelle au niveau transcriptionnel. Afin de déterminer quels sont les gènes fonctionnellement régulés par NANOG, OCT4 et SOX2, l'équipe de Loh a réalisé des

expériences d'inhibition spécifique de l'expression de NANOG ou d'OCT4 par interférence de l'ARN et analysé, par la technique des puces à ADN, les variations des niveaux d'expression de leurs gènes cibles (Loh et al. 2006). Ils ont ainsi identifié dans les cellules souches embryonnaires de souris 77 gènes régulés par NANOG et par OCT4, via des sites de fixation pour ces facteurs.

L'identification des acteurs impliqués dans les processus moléculaires qui dirigent l'identité des cellules souches embryonnaires a également fortement bénéficié de la mise au point de technologies exploratoires exhaustives de l'expression des gènes par une approche utilisant le transcriptome (Calhoun et al. 2004). Ces études ont montré d'une part des différences de profil d'expression entre les différents types de cellules pluripotentes, par exemple entre les cellules de carcinome embryonnaire et les cellules souches embryonnaires (Ying Liu et al. 2006), mais aussi entre espèces entre les cellules souches embryonnaires humaines et murines (Sato et al. 2004). En revanche, les profils d'expression de différentes lignées de cellules souches embryonnaires d'une même espèce restent très proches sans être identiques (Ying Liu et al. 2006).

Par la suite, plusieurs études, dont celle menée par l'équipe américaine de Jaenisch, ont posé les bases du mécanisme de pluripotence en découvrant que les protéines codées par ces trois gènes clés étaient capables de se fixer mutuellement dans leurs propres séquences promotrices établissant ainsi une boucle d'auto-régulation (Boyer et al. 2005). Par exemple, les protéines OCT4 et SOX2 reconnaissent le promoteur du gène *NANOG* (Rodda et al. 2005) (Figure 16).

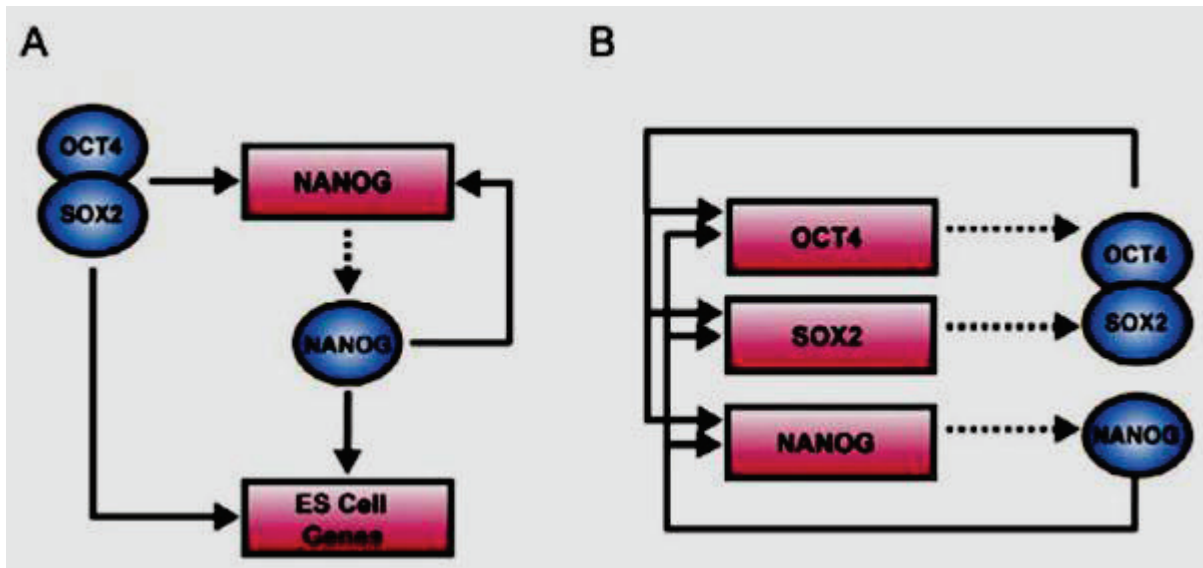


Figure 16 : Motifs de régulation transcriptionnelle dans les cellules souches embryonnaires humaines (Rodda et al, *Journal of Biological Chemistry*, 2005)

(A) Exemple de relations autorégulatrices entre les 3 facteurs « clés » de pluripotence. Les régulateurs sont représentés par des cercles bleus ; les promoteurs des gènes par des rectangles roses. La liaison d'un régulateur à un promoteur est indiquée par une flèche pleine, les gènes codant pour les régulateurs sont liés à leur régulateur respectif par des flèches pointillées. (B) Boucle autorégulatrice interconnectée formée par OCT4, SOX2 et NANOG.

Ces études démontrèrent également que ces protéines co-occupaient les promoteurs de plus de 300 gènes dont certains étaient déjà identifiés comme jouant un rôle fondamental soit dans l'identité cellulaire, soit dans la différenciation spécifique de lignage. De plus, ce réseau génique semble être régulé de manière précise par des modulations de la balance d'expression de ces 3 gènes pouvant induire un signal de différenciation vers l'un des lignages spécifiques. En effet, le maintien de l'expression de SOX2 est nécessaire à l'induction et au maintien de l'identité neurale (Graham et al. 2003) alors que les variations du niveau d'expression d'OCT4 semblent réguler la différenciation précoce (Rodriguez et al. 2007) notamment celle du mésoderme cardiaque en agissant comme un compétiteur avec d'autres facteurs comme SOX17 (Stefanovic et al. 2009). Les travaux de recherche actuels s'orientent vers une meilleure compréhension des relations géniques existant entre ces 3 gènes clés de pluripotence et ceux identifiés comme fortement exprimés dans les cellules souches embryonnaires humaines ou intervenant dans la différenciation précoce.

De nombreuses études fonctionnelles ont permis de mettre en évidence qu'une partie des gènes présentant des sites de fixation pour *NANOG*, *OCT4* et *SOX2*, est directement impliquée dans le contrôle de l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules souches embryonnaires. En effet, l'inactivation des gènes *Esrrb* (Estrogen-related receptor β) et *Rif1*

(Rap1 interacting factor 1 homolog), par la technique d'interférence à l'ARN, induit la différenciation des cellules souches embryonnaires (Loh et al. 2006; Ivanova et al. 2006). Dppa4 (Developmental pluripotency-associated 4) inhibe la différenciation des cellules souches embryonnaires en ectoderme primitif (Masaki et al. 2007). L'inhibition de l'expression de Tbx3 (T-box 3) et Tcl1 (T-cell lymphoma breakpoint 1) induit également la différenciation des cellules souches embryonnaires (Ivanova et al. 2006), quant à leur surexpression elle inhibe leur différenciation dans le lignage mésodermique pour Tbx3 et dans les trois lignages endoderme, mésoderme et ectoderme pour Tcl1. L'inactivation de Zic3 (Zinc finger protein of the cerebellum) induit la différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules de type endodermique (Lim et al. 2007). Le répresseur neuronal REST (RE1-silencing transcription factor) quant à lui permettrait le maintien en auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires en inhibant le micro-ARN mir-21 dont l'expression induit la différenciation des cellules souches embryonnaires (S. K. Singh et al. 2008). Ces gènes sont les plus récurrents lorsque l'on compare les travaux qui ont été réalisés pour identifier les gènes qui sont primordiaux pour la pluripotence des cellules souches embryonnaires (Boyer et al. 2005; Loh et al. 2006; Ivanova et al. 2006; Matoba et al. 2006; Sharov et al. 2008; J. Kim et al. 2008).

NANOG, OCT4 et SOX2 permettent donc le maintien des cellules souches embryonnaires en auto-renouvellement par régulation de l'expression des gènes qui jouent un rôle important dans le maintien de la pluripotence puisque leur inactivation induit la différenciation des cellules souches embryonnaires alors que leur surexpression inhibe leur différenciation (*figure 17*).

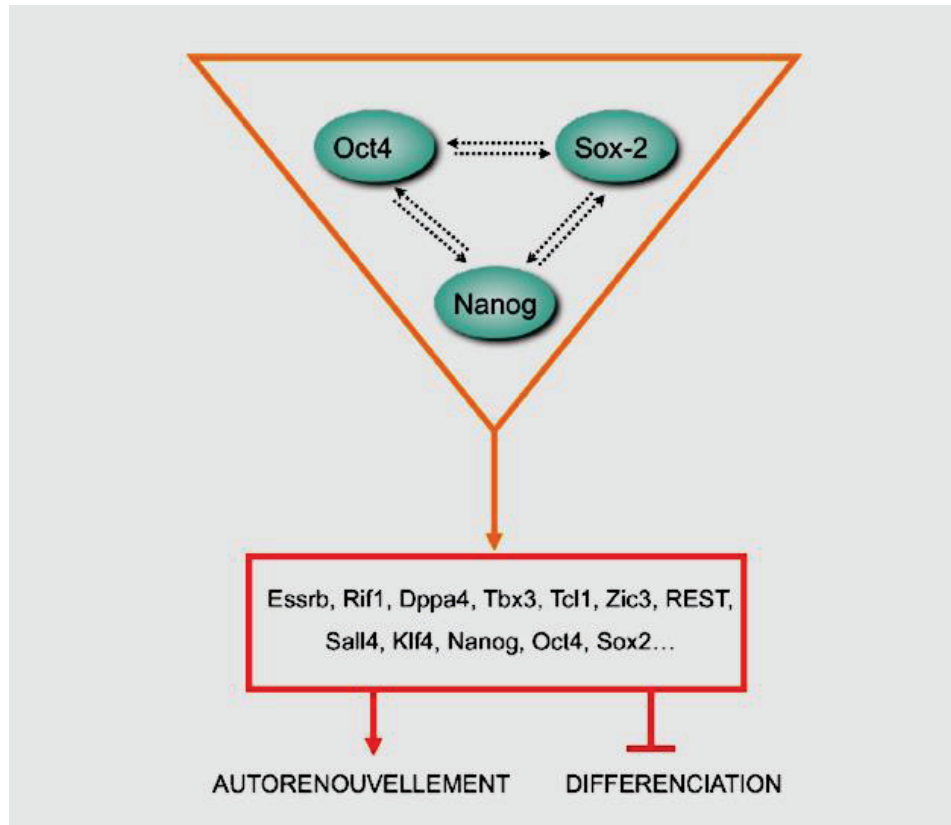


Figure 17 : Réseau de régulation transcriptionnelle mis en place par NANOG, OCT4 et SOX2 dans les cellules souches embryonnaires (Pesce and Scholer, *STEM CELLS*, 2001)

Ce réseau de régulation transcriptionnelle reste cependant encore bien incomplet et de nombreux éléments s'y ajoutent régulièrement.

Cependant, quelques études ont également montré que l'activité répressive de NANOG était indépendante d'OCT4 et SOX2 et que son influence sur ses deux facteurs était très minime (Navarro et al. 2012). Par contre, OCT4 et SOX2 s'autoréguleraient mutuellement. En effet, le facteur OCT4 peut activer ou réprimer la transcription en interagissant avec SOX2 (Pesce and Schöler 2001; Chew et al. 2005). L'inactivation de SOX2 induit un phénotype similaire à celui observé pour l'inactivation du gène OCT4 lui-même, c'est-à-dire l'arrêt du développement embryonnaire au stade blastocyste.

De plus, le rôle des deux facteurs de transcription pluripotents, NANOG et OCT4, dans les cellules souches humaines pluripotentes normales et transformées (par modification épigénétique) serait différent. En effet, une cellule souche pluripotente transformée aurait une hypersensibilité dans la réduction de NANOG avec une perte complète d'auto-renouvellement couplé avec l'apoptose. A l'inverse, les cellules souches humaines normales sont sensibles à l'expression d'OCT4 dans leur survie et leur auto-renouvellement. Les rôles divergents de ces facteurs de transcription établissent un paradoxe pour développer de nouvelles thérapies à

l'ensemble de la destruction sélective de tumeurs agressives arborant les cellules souches cancéreuses avec des signatures moléculaires similaires (Ji et al. 2009).

III- Les protéines membranaires

Les protéines membranaires ont des fonctions cellulaires centrales : le transport de nutriments (canaux, transporteurs, pompes), le stockage d'énergie (chaînes de transfert des électrons impliqués dans la respiration et la photosynthèse), la réception et la transduction de signaux, la catalyse enzymatique. Certaines protéines membranaires, comme SSEA1 ou SSEA3 peuvent intervenir dans les caractéristiques de la cellule souche telles que la pluripotence ou l'auto-renouvellement.

III-1. La protéine membranaire SSEA1

SSEA1 (Stage-Specific Embryonic Antigen 1) a historiquement été utilisé comme marqueur des cellules souches pluripotentes incluant les cellules souches embryonnaires et a été découvert pour la première fois sur les blastomères au stade 8 cellules de l'embryon (D Solter and Knowles 1978). Il est aussi connu sous le nom de CD15 (leucocyte Cluster of Differentiation 15), antigène Lewis X et trisaccharide 3-fucosyl-N-acetyllactosamine ou FAL (Capela and Temple 2002). SSEA-1 est un trisaccharide contenant du fucose. Des populations de cellules SSEA1⁺ ont récemment été identifiées chez l'adulte, sur des cellules matures de la rate, du cœur, du cerveau et de la moelle osseuse (expression du récepteur CD15 dans la différenciation myéloïde et les granulocytes) (Finan et al. 2012; Capela and Temple 2002; Anjos-Afonso and Bonnet 2007).

L'équipe de Chung rapporte l'établissement, chez la souris, de lignées de cellules souches embryonnaires à partir de blastomères sans affecter le développement embryonnaire (Chung et al. 2006). Cette équipe a ainsi établi cinq lignées cellulaires de cellules souches embryonnaires qui possèdent des caractéristiques de pluripotentialité et de capacité à former des tératomes chez la souris. En particulier, après injection dans des blastocystes, elles participent à la formation de tous les tissus chez l'hôte, y compris les lignées germinales. Ces cellules expriment les marqueurs des cellules souches embryonnaires : OCT4 et SSEA1.

D'autres études ont montré que les cellules SSEA1⁺ étaient de petites cellules souches embryonnaires isolées de la moelle osseuse adulte et pouvaient être une population de réserve pour les cellules provenant de tissu. Ces petites cellules souches embryonnaires migreraient de l'épiblaste (revêtement de l'embryon) et malgré l'expression de marqueurs de cellules

souches pluripotentes auraient des changements dans la signature épigénétique (modification transmissible et réversible de l'expression génique) de gènes imprimés (gènes soumis à une empreinte parentale c'est-à-dire qu'un seul des deux allèles est exprimé dans les cellules somatiques). Ces changements garderaient ces cellules quiescentes dans les tissus adultes et les préviendraient de la formation de tératome (tumeur formée par les cellules germinales pluripotentes) (D.-M. Shin et al. 2010).

III-1.1 Expression de SSEA1 dans les cellules souches de glioblastome

Dans l'étude menée par l'équipe de Son, seulement sept des douze lignées des cellules souches des glioblastomes étudiées étaient CD133⁺ (Son et al. 2009). Cependant, plus de 95% des glioblastomes contenaient des cellules souches de glioblastome SSEA1⁺.

Contrairement aux cellules CD133⁻ et SSEA1⁻, les cellules souches de glioblastome SSEA1⁺ expriment fortement différents marqueurs des cellules souches tels que SOX2, BMI1, EZH2, L1CAM, l'intégrine $\alpha 6$ et Olig2. Tout comme d'autres marqueurs de cellules souches tels le CD133, l'expression de SSEA1 diminue significativement avec le stade de différenciation cellulaire. Les cellules souches de glioblastome SSEA1⁺ sont fortement clonogéniques et hautement tumorigéniques in vitro. Elles sont capables de former des tumeurs secondaires après passages in vivo et peuvent recréer une tumeur entière en générant des cellules SSEA1⁺ et SSEA1⁻.

SSEA1 est un marqueur qui peut être utilisé comme marqueur secondaire pour l'identification des cellules souches de glioblastome CD133⁻ (Mao et al. 2009). Comme le marqueur SSEA1 est un marqueur des cellules souches neurales, ceci implique une forte relation entre les cellules souches du glioblastome et les cellules souches neurales qui pourrait expliquer une partie de leur origine.

III-1.2 Expression de SSEA1 dans le développement du système nerveux

SSEA1 a été identifié comme étant un marqueur cellulaire des cellules souches neurales embryonnaires au sein de la zone subventriculaire chez l'adulte (Capela and Temple 2002, 2006).

Plusieurs procédés fondamentaux sont induits dans l'établissement du système nerveux central incluant la prolifération, l'adhésion cellule-cellule et la migration. Lors du

développement embryonnaire de la dinde, SSEA1 est exprimé au niveau de la multipotence et de la prolifération de cellules épithéliales neurales et de cellules migratoires neurales. Plus tard, son expression était restreinte au composé dorsal du tube neural suggérant que l'antigène pourrait être induit dans le développement de composé sensoriel du système nerveux (D'Costa and Petite 2004). SSEA1 est aussi impliqué dans le développement d'autres espèces (Dodd and Jessell 1986; Oudega, Marani, and Thomeer 1992). Ces observations supportent ensemble le rôle de SSEA1 dans le développement du système nerveux des vertébrés.

III-1.3 Expression de SSEA1 au niveau des cellules mésenchymateuses

Les cellules SSEA1⁺ de la moelle osseuse ont été décrites comme des cellules progénitrices mésenchymateuses les plus primitives avec un potentiel à se différencier en trois lignées germinales in vitro (Kucia, Halasa, et al. 2006). Des cellules SSEA1⁺ qui ont été injectées dans la souris, ont le potentiel de devenir des cellules endothéliales et mésenchymateuses et à un faible degré des myocytes cardiaques (Anjos-Afonso and Bonnet 2007). L'expression de SSEA1 a aussi été associée avec une population spécifique multipotente de cellules souches de la moelle osseuse normale, connue comme « very small embryonic-like stem cells » (VSEL). Les VSEL sont identifiés comme SSEA1⁺, sca-1⁺, OCT4⁺ et CXCR4⁺ (Kucia, Reca, et al. 2006).

La fonction du marqueur de surface SSEA1 comme marqueur embryonnaire serait donc de jouer un rôle dans la pluripotentialité et plus précisément dans la différenciation des cellules souches embryonnaires.

III-2. La protéine membranaire SSEA3

SSEA3 (Stage-specific embryonic antigen 3) est un glycosphingolipide, plus spécialement, un oligosaccharide composé de cinq unités carbohydate connectées à un sphingolipide. Les sphingolipides ont été découvertes de manière originale en 1884 par Thudichum (Thudichum, 1884). Il est maintenant connu que la fonction des sphingolipides joue un rôle clé dans la signalisation cellulaire et que la molécule SSEA3 est important dans l'identification de plusieurs types de cellules de mammifères avec des caractéristiques de pluripotence des cellules souches. Durant le développement embryonnaire de l'homme, dès les premiers jours, l'expression de la protéine SSEA3 diminue, suggérant la perte des capacités pluripotentes des cellules souches embryonnaires humaines.

Cette protéine membranaire SSEA3 a été établit par immunisation d'animaux avec des embryons de souris de 4 à 8 cellules (Wright and Andrews 2009; D Solter and Knowles 1978; Shevinsky et al. 1982). SSEA3 est exprimé à la surface des cellules souches pluripotentes murines (Davor Solter et al. 1979; Evans and Kaufman 1981; Takahashi and Yamanaka 2006) et humaines (Thomson et al. 1998; Takahashi et al. 2007; Werbowetski-Ogilvie et al. 2009), au niveau de la masse cellulaire interne des embryons précoces, et au niveau des cellules iPS. Une étude a montré qu'il existait dans les fibroblastes de la peau et dans le stroma de la moelle osseuse des cellules de résistance à la différenciation différentielle multilinéaire (Muse) possédant une tolérance au stress et une pluripotence endogène (Kuroda et al. 2010). Ces cellules expriment fortement la protéine SSEA3.

Quelques études ont évalué l'expression de SSEA3 dans les cancers. Dans le cancer du sein, par exemple, 77,5% des cellules tumorales expriment fortement SSEA3 (Chang et al. 2008), de même pour le cancer pulmonaire (Levina et al. 2008). En 2013, l'équipe de Suzuki, a révélé l'existence d'une population SSEA3⁺ dans le cancer colorectal et clarifié les propriétés cellulaires des cellules SSEA3⁺ qui sont hautement tumorigènes et qui possèdent une forte capacité de prolifération (Suzuki et al. 2013).

D'autres études ont étudié plus spécifiquement SSEA3 au niveau des cellules souches tumorales. En effet, des cellules souches tumorales résistantes à la chimiothérapie ont été isolées après traitement in vitro. Elles expriment les marqueurs CD133, CD117, SSEA3, TRA1-81 et la β -caténine (Levina et al. 2008). L'expression de ces marqueurs permet de sélectionner les cellules souches tumorales permettant l'élaboration de lignées cellulaires tumorales amplifiables in vitro et formant des sphères tumorales. Ces cellules souches tumorales présentent une capacité clonogénique importante, des capacités aberrantes d'auto-renouvellement et une tumorigénicité élevée in vivo chez la souris (Eramo et al. 2007).

OBJECTIFS

Les antigènes embryonnaires OCT4, NANOG, SOX2, SSEA1 et SSEA3 faciliteraient la tumorigénèse par leurs propriétés d'auto-renouvellement, de prolifération et de pluripotence. Il existe peu d'études sur le lien entre les propriétés de ces antigènes embryonnaires et l'induction de la Leucémogénèse au niveau des hémopathies malignes.

Le but de cette thèse a donc été d'évaluer le lien entre l'expression des antigènes embryonnaires et la Leucémogénèse chez des patients atteints de Leucémie Aiguë Myéloïde.

Ce projet est divisé en deux parties avec une première partie qui a été consacrée à l'expression des antigènes embryonnaires sur des cellules de Leucémie Aiguë Myéloïde et sur des cellules hématopoïétiques, pour identifier de nouveaux facteurs permettant l'évaluation de la maladie résiduelle ainsi que de nouveaux facteurs pronostiques. Par la suite, la deuxième partie du travail s'est concentrée sur l'étude du rôle fonctionnel du marqueur OCT4 dans la Leucémie Aiguë Myéloïde et plus précisément dans les propriétés caractéristiques des Leucémies Aiguës Myéloïdes que sont le blocage de la différenciation et la prolifération anormale.

L'objectif final dans la compréhension du rôle physiologique cellulaire des antigènes embryonnaires pourraient nous permettre de déterminer s'ils sont à l'origine de la transformation maligne et s'ils contribuent à la rechute de la maladie.

MATERIEL & METHODES

I- Culture de lignées cellulaires

Pour cette étude, nous avons utilisé différentes lignées de cellules souches humaines. La lignée cellulaire NTERA-2 qui provient d'un carcinome embryonnaire humain, est une lignée cellulaire adhérente qui a été utilisée comme lignée témoin positif. La lignée U937 provenant d'un lymphome humain histiocytaire a été utilisée comme modèle d'étude apoptotique. Plusieurs lignées leucémiques provenant de leucémie aiguë myéloïde ont été utilisées, telles que HL60 (leucémie aiguë avec différenciation promyélocytaire), KG1a (leucémie aiguë myéloïde indifférenciée), THP-1 (leucémie aiguë monoblastique), NB4 (leucémie aiguë myéloïde possédant les anomalies PML-RAR α et t(15 ;17)), ME-1 (leucémie aiguë myéloïde possédant les anomalies CBF β -MYH11 et inv(16)), KASUMI (leucémie aiguë myéloïde possédant les anomalies RUNX1-RUNX1T1 et t(8 ;21)). Les lignées NTERA-2, U937, HL60, KG1a et THP-1 ont été achetées au laboratoire ATCC aux Etats-Unis et au laboratoire DSMZ en Allemagne. Les lignées HL60, KG1a, U937, THP-1, KASUMI et Me-1 sont cultivées dans un milieu RPMI-1640 supplémenté par 10% de SVF ou 20% de SVF pour Me-1, de la L-glutamine et de la Pénicilline-Streptomycine. La lignée NTERA-2 est cultivée dans le milieu DMEM 4,5g de glucose complémenté en pyruvate et supplémenté par 10% de SVF, de la L-glutamine, de la Pénicilline-Streptomycine et 5% de Horse Serum. La lignée NB4 est cultivée dans le milieu ISCOVE supplémenté par 10% de SVF, de la L-glutamine et de la Pénicilline-Streptomycine. Les cellules sont cultivées à 37°C, en atmosphère humide 5% CO₂ dans des flasques de culture et le milieu de culture est renouvelé deux jours par semaine.

II- Marquages cellulaire par Cytométrie en Flux (CMF)

II-1. Protocole technique

Pour faire la technique de cytométrie en flux, 5 anticorps embryonnaires d'intérêt (SSEA1, SSEA3, OCT3/4, NANOG et SOX2 (BD Biosciences)) et 8 anticorps membranaires (CD45, CD34, CD38, CD117, CD123 (BD Biosciences), CD90 (Beckman Coulter), CD133 (Myltenyi Biotech) et HLA-DR (Biolegend)) ont été utilisés (*Tableau 6*).

L'étude de l'expression a été réalisée au diagnostic, sur 103 moelles osseuses de patients atteints de LAM et au suivi, sur 69 moelles osseuses de patients traités selon le protocole multicentrique GOELAMS (dont 40 patients étaient en rémission complète et 29 qui ont rechuté après traitement). Les patients étaient âgés de 3 à 88 ans et départagés en

fonction des anomalies génétiques et moléculaires (n=8 t(15 ;17)/PML-RAR α , n=6 inv(16)/CBF β -MYH11, n=3 t(8 ;21)/RUNX1-RUNX1T1, n=44 caryotypes normaux, n=42 caryotypes complexes). Une comparaison de l'expression a été faite avec 10 moelles osseuses de donneurs sains provenant de dons d'allogreffe.

Le protocole de cytométrie en flux a été réalisé de la façon suivante :

La moelle a été énumérée à l'aide de bleu acétique puis lavée au PBS supplémenté par 0,5% de BSA et 0,5% d'AZ afin d'obtenir une concentration finale de 1million de cellules par mL. On réalise le marquage membranaire en ajoutant 5 μ L d'anticorps de différenciation (CD45, CD34, CD38, HLA-DR, CD133, CD117, CD123, CD90) et 20 μ L d'anticorps membranaires spécifiques (SSEA1 et SSEA3) puis on incube pendant 15 minutes à température ambiante et dans le noir.

Ensuite, nous lysons la moelle avec de la lyse BD pour avoir une dissociation complète des cellules sanguines et nous lavons au PBS/BSA/AZ pendant 5minutes à 2000 tours. Le culot est remis en suspension dans du Cytofix Fixation Buffer (BD Biosciences®) à 1 millions de cellules par mL pendant 20 minutes afin de fixer nos cellules.

Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS/BSA/AZ (2000 tours/5 min) et le culot est remis en suspension dans le Perm Wash Buffer 1X (BD Biosciences®) à 1 million de cellules par mL pour perméabiliser la membrane cellulaire. Dans le même temps, on réalise le marquage intracytoplasmique en ajoutant 20 μ L de NANOG, OCT $\frac{3}{4}$ et SOX2, puis on incube pendant 20 minutes à température ambiante et dans le noir.

Comme témoins, nous avons utilisé des contrôles isotypiques (20 μ L) (BD Biosciences®) qui correspondent à des anticorps non-spécifiques conjugués au même fluorochrome et ayant la même concentration que l'anticorps spécifique. Ces contrôles sont utilisés pour montrer qu'il n'y a pas de fixation non-spécifique d'un anticorps spécifique.

Les cellules sont ensuite lavées au PBS/BSA/AZ (2000 tours/5 min) et les culots sont repris dans 300 μ L de PBS et peuvent être passés au cytomètre. Pour analyser les antigènes embryonnaires exprimés dans les cellules normales et leucémiques, nous utiliserons un cytomètre en flux (CMF) BD FACS CANTO II avec les logiciels associés BDFACSDiva (BD Biosciences®) pour l'acquisition et InfinicytTM (Cytognos S.L.®) pour l'analyse.

Nous ferons une analyse de 500 000 événements (500 000 cellules par seconde passeront devant le détecteur).

II-2. Stratégie d'analyse

Un fenêtrage sur les leucocytes (à partir du graphe CD45/SSC) a été fait afin de discriminer différentes populations cellulaires. Au sein du compartiment CD45^{low} (*Figure 18 (1)*), les cellules les plus matures, incluant les mastocytes et les cellules dendritiques plasmacytoïdes ont été éliminées à l'aide des marqueurs exprimant HLA-DR, CD117 et CD123. De plus, les hémogones ont été éliminés par l'expression aberrante du CD38 et à l'aide des paramètres SSC^{low} et FSC^{low}. Les cellules restantes ont été ciblées par CD34⁺ (*Figure 18 (2)*) et afin d'établir la positivité des cellules CD38, nous avons pris trois intervalles de référence : lymphocytes, hémogones et plasmocytes (*Figure 18 (3)*). Avec l'ensemble de ces paramètres les cellules ont été séparées en trois sous-populations : CD34⁺CD38^{low}, CD34⁺CD38⁺ et CD34⁻CD38^{low} (*Figure 18 (4)*). Au sein de la sous-population CD34⁺CD38^{low}, CD90 a permis l'identification de la sous-population cellulaire cellule souche hématopoïétique (CSH) /cellule progénitrice.

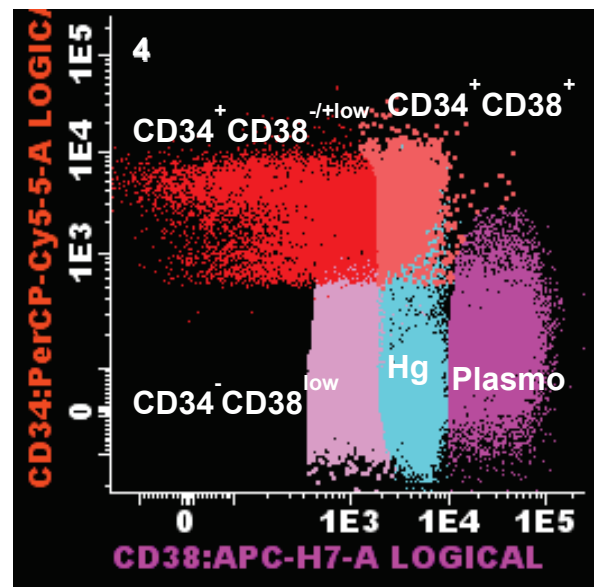
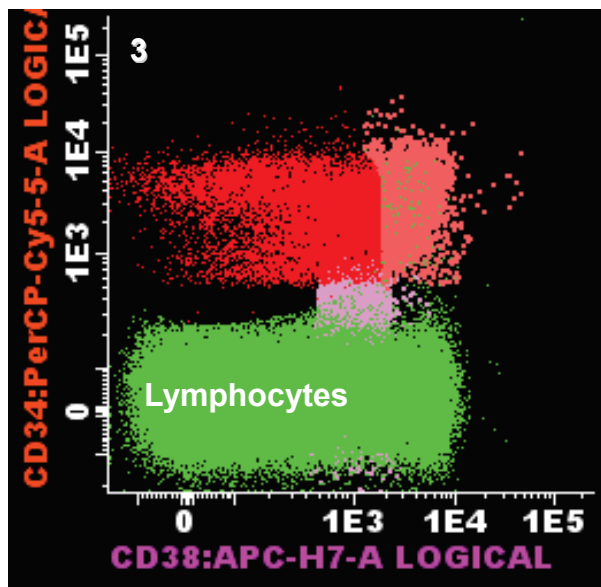
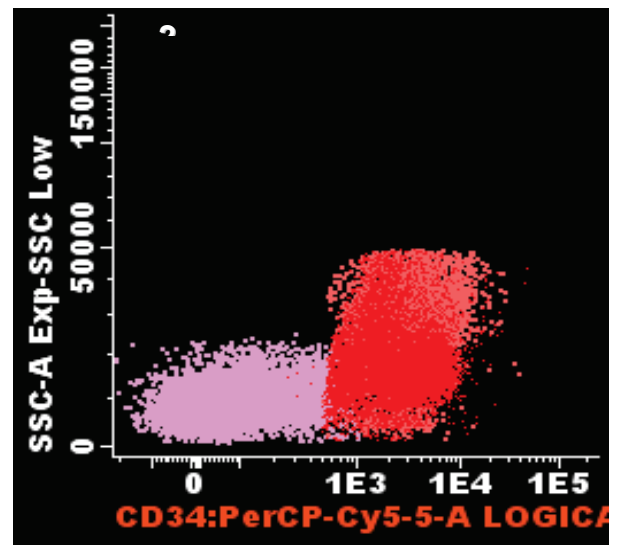
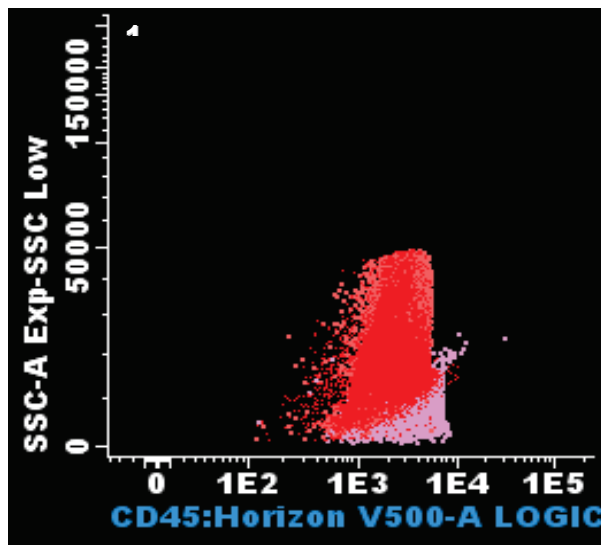


Figure 18 : Stratégie d'analyse par Cytométrie en Flux

Anticorps	Fournisseurs	Clone	Fluorochrome	Concentration
Mouse anti-HLA-DR	Biolegend(CA,USA)	L243	Pacific Blue	0.5µg/100µL
Mouse anti-CD45	BD Horizon(CA,USA)	HI30	V-500	1µg/100µL
Mouse anti-CD38	BD Biosciences(CA,USA)		APC-H7	5µg/100µL
Mouse anti-CD34	BD Biosciences		PerCp-Cy5.5	5µg/100µL
Mouse anti-CD90	Beckman Coulter(CA,USA)		PE	1.25µg/100µL
Mouse anti-CD123	MACS Miltenyi Biotec (Bergisch, Germany)		FITC	0.6µg/100µL
Mouse anti-CD117	BD Biosciences	104-D2	Pe-Cy7	2.5µg/100µL
Mouse anti-CD133/1	MACS Miltenyi Biotec	AC133	APC	2.5µg/100µL
Mouse anti-SSEA1	BD Pharmingen(CA,USA)	MC480	FITC	20µg/100µL
Mouse anti-SSEA3	BD Pharmingen	MC-631	FITC	20µg/100µL
Mouse anti-NANOG	BD Pharmingen	N31-355	Alexa Fluor 488	20µg/100µL
Mouse anti-SOX2	BD Pharmingen	245610	Alexa Fluor 647	20µg/100µL
Mouse anti-OCT3/4	BD Pharmingen	40/OCT-3	Alexa Fluor 647	20µg/100µL
Mouse IgG1 κ Isotype control	BD Biosciences	MOPC-21	Alexa Fluor 647	20µg/100µL
Mouse IgM κ Isotype control	BD Biosciences	G155-228	FITC	0.5mg/mL
Mouse IgG1 κ Isotype control	BD Biosciences	MOPC-21	Alexa Fluor 488	20µg/100µL

Tableau 6 : Anticorps utilisés en cytométrie en Flux

III- Quantification génique / qRT-PCR

Les expressions des gènes *FUT4*, *POU5F1*, *NANOG* et *SOX2* ont été étudiées, en triplicat, sur l'ensemble des lignées cellulaires leucémiques, sur les cellules de donneurs (n=4) et de patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (n=4 t(8 ;21) ; n=4 inv(16) ; n=4 t(15 ;17), n=4 caryotype normal).

En ce qui concerne les patients, les cellules mononucléées ont été isolées par gradient de densité (Ficoll). Les ARN des lignées cellulaires ou des cellules mononucléées de la

moelle osseuse sont extraits par une méthode au phénol et chloroforme (Trizol). L'ARN est quantifié par spectrophotométrie (Nanodrop ND 1000), et qualifié sur un Bioanalyseur (Agilent). 1 µg d'ARN est ensuite rétrotranscrit en ADNc par MMLVRT. La quantification, en triplicatas, des gènes d'intérêt (Tableau 2) est réalisée par qPCR sur 7900HT Fast Real-Time PCR System selon le cycle suivant : 50°C pendant 2min et 95°C pendant 10min, suivi de 50 cycles à 95°C pendant 15s et à 60°C pendant 1min. Les expressions relatives des gènes ont été déterminées par la méthode du Ct comparatif ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) avec le logiciel d'analyse SDS2.3. Le gène *HMBS* a été utilisé comme contrôle endogène pour normaliser les données d'expression. Ce gène a été démontré à être largement exprimé dans les cellules souches et est très utile pour les études de qRT-PCR (Lemma et al. 2016).

Gène	Description	ID	Longueur Amplicon (bp)
<i>HMBS</i>	hydroxymethylbilane synthase	Hs00609296_g1	69
<i>POU5F1</i>	POU class 5 homeobox 1	Hs00999632_g1	77
<i>NANOG</i>	Nanog homeobox	Hs04399610_g1	101
<i>SOX2</i>	SRY (sex determining region Y)-box 2	Hs01053049_s1	91
<i>FUT4</i>	Fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)	Hs01106466_s1	152

Tableau 7 : Amorces utilisées en qRT-PCR (TaqMan Gene Expression Assay)

IV- Etude de la différenciation

Une fois que les antigènes embryonnaires ont été montrés comme s'exprimant dans les cellules souches leucémiques par rapport aux cellules souches normales, une technique de différenciation des lignées cellulaires (NTERA-2, HL60, KG1a, NB4, KASUMI et ME-1) est mise en place afin de voir si ces antigènes embryonnaires sont modifiés pendant la différenciation.

Ce mode opératoire consiste à différencier des cellules vers la voie granuleuse (neutrophiles). Les lignées cellulaires leucémiques seront différenciées par utilisation de l'acide rétinoïque pour une différenciation granuleuse. Cette technique sera réalisée en triplicata.

Utilisation de l'acide rétinoïque :

On réalise une boîte témoin (sans acide rétinoïque) et une boîte test (avec acide rétinoïque) dans laquelle on ajoute 4 μL d'acide rétinoïque à $2 \times 10^{-3} \text{M}$ dans 8mL de milieu de culture pour avoir une concentration finale de 1 μM . On ajoute 4 millions de cellules par mL dans chaque boîte.

On laisse environ 7 jours en contact à l'étuve à 37°C 5% CO_2 et on reprend les cellules en suspension.

Les cellules sont ensuite marquées avec 5 μL d'anticorps membranaires de différenciation (CD45, CD34, CD38, CD90 et CD11b (marqueur de différenciation granuleuse)) et 20 μL d'anticorps embryonnaires d'intérêt (SSEA1, SSEA3, NANOG, SOX2, OCT4).

Les cellules sont ensuite lavées au PBS/BSA/AZ (2000 tours/5 min) et les culots sont repris dans 300 μL de PBS/BSA/AZ et peuvent être passés au cytomètre. Nous ferons une analyse de 200 000 événements.

V- Etude morphologique par cytopins

Afin de vérifier si nous avons une différenciation granuleuse des lignées cellulaires leucémiques (NTERA-2, HL60, KG1a, NB4, KASUMI et ME-1), nous réalisons un contrôle morphologique à l'aide de la technique des cytopins qui est une technique de coloration de lames. Cette technique se réalisera sur les lignées cellulaires sans et avec traitement à l'acide rétinoïque.

Pour cela, nous déposons sur des lames fixées à un dispositif 100µL de suspension cellulaire à 1 million de cellules par mL, puis on centrifuge 10 minutes à 600 tours par minutes, on laisse sécher et on colore les lames au Giemsa à l'aide d'un appareil à coloration dans lequel les lames sont trempées une première fois dans du May Grunwald pendant 3 minutes, dans du May Grunwald ½ pendant 3 minutes, dans du tampon Buffer pendant 10 secondes, dans du Giemsa à 5% pendant 10 minutes et dans de l'eau pendant 10 secondes. On laisse ensuite sécher les lames et elles sont analysées, grâce au logiciel « LUCIA », sur ordinateur relié à un microscope possédant un appareil de capture.

VI- Etude de la prolifération cellulaire par le test WST-1

Le test WST-1 est un test de détection colorimétrique de l'activité enzymatique. Il est basé sur la réduction du WST en formazan, donnant une couleur jaune-orange. C'est une méthode rapide et simple de numération de cellules vivantes, très utilisée dans les études de cytotoxicité. Nous avons utilisé le réactif du fournisseur Roche. Il nous permet de mesurer le taux de prolifération cellulaire et réciproquement la diminution de la viabilité cellulaire. Pour chaque type cellulaire, la relation linéaire entre le nombre de cellules et le signal produit est établie nous permettant ainsi une quantification précise des changements de taux de modification de la prolifération des cellules.

Les cellules (NTERA-2, HL60, KG1a, NB4, KASUMI et ME-1) sont mises en duplicata à une concentration de 4.10^3 cellules /100µL dans des puits d'une plaque 96 puits. Dans chaque puits, est ajouté 10µL de WST et la plaque est laissée 4h dans l'étuve à 37°C et 5%CO₂. L'absorbance de chaque puits est lue à 450nm sur un lecteur de plaques, ce qui nous donne ensuite la quantité de cellules vivantes, grâce au calcul suivant :

% de viabilité cellulaire = 100 x ((moyenne absorbance des cellules inhibées - moyenne absorbance du blanc) / moyenne absorbance des cellules témoins)

Un second témoin a été utilisé qui est le blanc correspondant au milieu de culture pur sans cellules.

VII- Tests clonogéniques

Ces tests permettent d'évaluer le nombre de colonies leucémiques. Pour cela, les lignées de cellules leucémiques (NTERA-2, HL60, KG1a, NB4, KASUMI et ME-1) seront incubées dans la méthylcellulose qui possède un milieu de culture contenant un facteur de croissance (STEMα). Les cultures sont traitées avant et après traitement avec l'acide

rétinoïque à une concentration finale de 500 000 cellules/mL. Les colonies CFU-GM (cellules de la moelle osseuse à l'origine des granulocytes, monocytes, macrophages), BFU-E (cellules à l'origine des érythrocytes) et CFU-L (cellules à l'origine des lymphocytes) sont analysés après 14 jours d'incubation.

VIII- Inhibition par ShRNA

Le gène embryonnaire *POU5F1* qui a été vu comme jouant un rôle dans les propriétés de cellules souches leucémiques, va être inhibé par la technique ShRNA. Cette technique consiste à inhiber l'expression d'un gène cible par interférence ARN. L'expression du ShRNA sera obtenue par transfection de plasmides par des vecteurs viraux dans les cellules. A partir des plasmides contenant le ShRNA d'intérêt (*Figure 19A : plasmide bactérien*), nous allons intégrer ce plasmide à l'aide d'un vecteur viral dans le génome de l'hôte et ainsi le ShRNA s'exprimera et ciblera le gène d'intérêt à inhiber.

Cette technique s'effectue avec 5 stocks glycérols bactériens contenant le gène *POU5F1* (Sigma Aldrich Mission®) et sur un plasmide témoin (pLKO.1-puro Empty Vector Control) (*Figure 19B : plasmide témoin*) ne contenant pas d'insert et qui sert de témoin négatif (Sigma Aldrich Mission®).

Pour cette technique, on va remettre les stocks bactériens en suspension et les placer dans un tube de culture stérile contenant 0,5mL de TB sans antibiotiques.

On incube la culture à 37°C en remuant toutes les 20 minutes.

En utilisant une anse stérile, on strie 50µL de la culture incubée sur des plaques préparées contenant du LB agar et de la carbenicilline et on laisse incuber dans une atmosphère humide pour 15-20h à 37°C. On isole une seule colonie de la plaque et on l'utilise comme un inoculum source pour des applications en aval.

L'ADN plasmidique est ensuite purifié à l'aide d'un kit de purification des plasmides (Macherey-Nagel®).

Nous réalisons ensuite une co-transfection des plasmides ShRNA avec un clone lentiviral OmicsLinkTM dans des cellules d'encapsulation lentivirale (cellules 293T qui sont des cellules humaines épithéliales de rein transformées par un adénovirus) afin que celles-ci produisent des particules pseudovirales contenant les constructions lentivirales.

Pour cela, on calcule le ratio du réactif de transfection plasmidique ShRNA qui est déterminé avec 1 μ g d'ADN plasmidique ShRNA et 3 μ L de réactif de transfection plasmidique ShRNA.

On prépare une solution A, où l'on dilue 10 μ L d'ADN plasmidique ShRNA dans 90 μ L de milieu de transfection plasmidique ShRNA. Puis on prépare une solution B, où l'on dilue 3 μ L de réactif de transfection plasmidique ShRNA avec assez de milieu de transfection plasmidique ShRNA pour arriver à un volume final de 100 μ L.

On ajoute la solution A à la solution B et on incube pendant 15-45 minutes à température ambiante.

On lave les cellules deux fois avec 2mL de transfection ShRNA.

Pour chaque transfection, on ajoute 0,8mL de milieu de transfection plasmidique par puits puis 200 μ L de la solution (A+B) puis on incube 5-7h à 37°C dans un incubateur.

On ajoute 1mL de milieu de croissance contenant 2 fois la concentration en antibiotiques et en sérum normal puis on incube les cellules entre 18-24h sous conditions normalement utilisées à la culture cellulaire.

Les pseudovirus produits sont ensuite transduits dans des cellules cibles (HT-1080 qui sont des cellules de fibrosarcome humain) afin d'obtenir la construction lentivirale avec son expression stable. Pour sélectionner les cellules transduites, on réalise une titration puromycine. Pour cela, on met 5 μ g/mL de Puromycine et 48h après la transfection, on enlève le milieu et on remet du milieu neuf contenant de la Puromycine à la concentration appropriée. Tous les 2-3 jours (pendant 15 jours), on enlève et on remet du milieu neuf.

Après la sélection positive, on récupère les lentivirus afin d'infecter nos cellules cibles (HL60, KG1a, NB4, KASUMI et ME-1) (100 000 cellules présentes dans du milieu RPMI-1640) à une concentration de 5 MOI (Multiplicity Of Infection calculé comme le PFU [Plaque-Forming-Unit]/nombre de cellules, c'est-à-dire le nombre de particules capable de former des plaques par unité de volume) dans une atmosphère humide à 37°C 5% CO₂. 8h après infection par les virus, nous changeons le milieu de culture par du milieu neuf de RPMI-1640 supplémenté par 10% de SVF, sans virus, et nous laissons incuber 40h. Ensuite nous réalisons nos marquages embryonnaires afin de vérifier l'expression des antigènes

embryonnaires par cytométrie en flux. Après infection, nous étudions également la différenciation cellulaire et la clonogénicité.

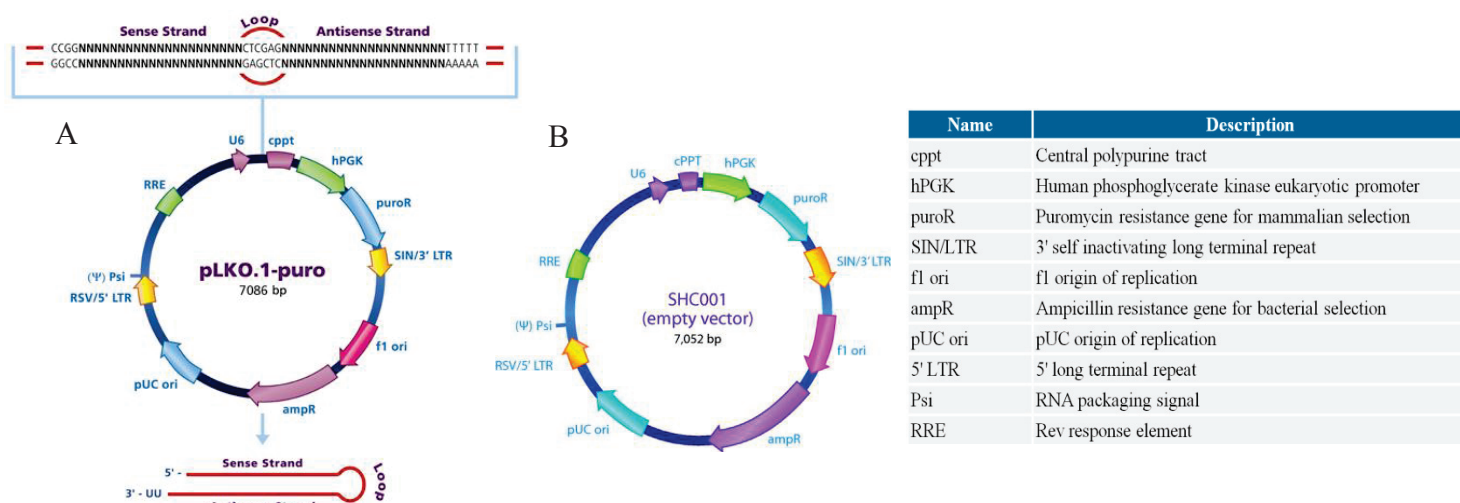


Figure 19: Carte de restriction du vecteur pLKO.1-puro et du vecteur témoin SHC001

Les vecteurs pLKO.1 et SHC001 sont des plasmides à base de virus VIH. Ils sont sûrs à utiliser en raison de leurs caractéristiques modifiées (suppression d'un certain nombre de gènes accessoires impliqués dans la virulence du VIH, génome minimal des particules virales, caractéristiques de non-réplication et auto-inactivation), ce qui rend incapable de produire le virus une fois infecté dans la cellule hôte. Les particules virales sont infectieuses déficientes et non lytiques et peuvent infecter les cellules-cibles et leur transmettre le gène d'intérêt en s'intégrant dans le génome de la cellule hôte. L'expression du gène est possible grâce à la présence de séquences LTR (long terminal repeat) présentes en 5' et 3'. Le gène de sélection vis-à-vis des cellules eucaryotes infectées par le virus et qui leur confère une résistance à la puromycine (Puro) est sous le contrôle du promoteur murin de la phosphoglycerate-kinase (PKG).

Pour cette inhibition d'expression, nous avons utilisé 5 construits différents pour *POU5F1* ciblant différentes régions dans la séquence génique. Chacun de ces construits se trouvent dans le vecteur plasmidique lentiviral, pLKO.1-puro suivi par la transformation en *Escherichia coli*. Les plasmides recombinants ont été sélectionnés pour leur résistance à la puromycine et transduits dans les cellules HEK293. Tous les virus ont été propagés et purifiés sur un gradient CsCl en utilisant des méthodes standards. Les virus ont été titrés pour leurs particules virales en utilisant les méthodes standards basées sur la spectrophotométrie à 260nm. Le titre fonctionnel (Plaque Forming Units) a été déterminé sur des cellules HEK293.

Nous avons utilisé pour *POU5F1* :

1- TRCN0000004883, région CDS:

CCGGACTATGCACAACGAGAGGATTCTCGAGAATCCTCTCGTTGTGCATAGTTTT
TT

2- TRCN0000004882, région CDS:

CCGGGAGATTGATAACTGGTGTGTTCTCGAGAACACACCAGTTATCAATCTCTTTT
T

3- TRCN0000004881, région CDS:

CCGGCCCTCACTTCACTGCACTGTACTCGAGTACAGTGCAGTGAAGTGAGGGTTT
TT

4- TRCN0000004880, région CDS:

CCGGCGTAGGTTCTTGAATCCCGAACTCGAGTTCGGGATTCAAGAACCTACGTTT
TT

5- TRCN0000004879, région 3UTR:

CCGGTCATTCACTAAGGAAGGAATTCTCGAGAATTCCTTCCTTAGTGAATGATTTT
T

RESULTATS

➤ **Article 1. Expression of Embryonic Stem Cells markers in Acute Myeloid Leukemia**

Picot T, Aanei C, Fayard A, Flandrin-Gresta P, Tondeur S, Gouttenoire M, Tavernier-Tardy E, Wattel E, Guyotat D, Campos L

Publié à Tumor Biology

➤ **Article 2. Potential Role of OCT4 in Leukemogenesis**

Picot T, Kesr S, Wu Y, Aanei C, Fandrin-Gresta P, Tondeur S, Tavernier-Tardy E, Wattel E, Guyotat D, Campos L

In Press à Stem Cells & Development

➤ **Résultats préliminaires (non publiés) : Evaluation de l'expression des antigènes embryonnaires à travers les voies de signalisation NOTCH et AKT**

Article 1

Expression of Embryonic Stem Cells markers in Acute Myeloid Leukemia

Picot T, Aanei C, Fayard A, Flandrin-Gresta P, Tondeur S, Gouttenoire M, Tavernier-Tardy E, Wattel E, Guyotat D, Campos L

Publié à Tumor Biology

Ces résultats ont fait l'objet de deux Communications Orales et de deux Présentations Poster.

Picot T, Aanei C., Fayard A., Kesr S., Wu Y., Tondeur S., Flandrin-Gresta P., Tavernier-Tardy E., Guyotat D., Campos-Catafal L. Expression of embryonic antigens in leukemic stem cells. **Symposium on Flow Cytometry**, Bucharest, Roumanie, 9 Juin 2017. **Présentation orale**.

Picot T, Aanei C., Flandrin Gresta P., Tavernier E., Guyotat D., Campos Catafal L. Expression de certains antigènes embryonnaires dans les cellules de Leucémie Aiguë Myéloïde. **18^{ème} Congrès Annuel de l'Association Française de Cytométrie (AFC)**, Lille, 4-6 Novembre 2014. **Présentation orale et Poster**.

Picot T, Aanei CM, Flandrin Gresta P, Tavernier E, Guyotat D, Campos Catafal L. Embryonic stem cells antigens (ESCA) expression in acute myeloid leukemia cells. Proceedings of the AACR, Part 1, 55, abstract n°1961, p.473, 2014. **American Association Cancer Research Annual Meeting**. San Diego, CA, April 5-9th, 2014. **Poster**.

Comme décrit précédemment, la Leucémie Aiguë Myéloïde est une hémopathie maligne caractérisée par l'expansion et la résistance à l'apoptose de cellules progénitrices myéloïdes indifférenciées. Ce clone leucémique proviendrait d'une prolifération de cellules souches leucémiques qui possèdent des propriétés d'auto-renouvellement et de non-différenciation. Malgré des avancées dans la détermination des cellules souches leucémiques, les thérapies actuelles ne permettent pas de cibler spécifiquement ces cellules et ces dernières sont quasiment systématiquement responsables de la rechute des patients.

Dans cette étude, nous avons évalué l'expression des antigènes embryonnaires, par cytométrie en flux et qRT-PCR, dans les leucémies aiguës myéloïdes. En effet, les antigènes embryonnaires possèdent les capacités d'auto-renouvellement, de pluripotence et de différenciation au niveau des cellules souches embryonnaires et pourraient être impliqués

dans la persistance de ces propriétés au niveau des cellules souches leucémiques de patients atteints de Leucémie Aiguë Myéloïde. Ainsi, une comparaison de l'expression de trois facteurs de transcription OCT4/NANOG/SOX2 ainsi que de deux marqueurs membranaires SSEA1/SSEA3 a été réalisée sur la population totale de blastes (définie comme cellules CD45^{low}) et sur les cellules CD34⁺ de moelle osseuse de donneurs sains et de patients atteints de leucémie aiguë myéloïde. De plus, une recherche de corrélations entre l'expression de ces antigènes embryonnaires et les caractéristiques biologiques et cliniques a été faite. Nous avons pu observer une expression des marqueurs embryonnaires OCT4, NANOG, SOX2 et SSEA3 dans l'ensemble des cellules leucémiques et cette expression est plus importante dans les cellules leucémiques immatures CD34⁺CD38⁻ que dans les cellules leucémiques matures CD34⁺CD38⁺. A l'inverse, SSEA1 était plus exprimé dans les cellules CD34⁺CD38⁺ et moins dans les cellules CD34⁺CD38⁻. Toutefois, nous n'avons pas trouvé de corrélation avec les données biologiques et lorsque nous avons évalué la valeur pronostique d'OCT4, NANOG, SOX2 et SSEA3, sur une série de patients traités de façon homogène selon le protocole multicentrique GOELAMS, nous avons observé qu'il y avait une tendance à avoir une meilleure survie totale et sans rechute lorsque l'expression des marqueurs était élevée. Ces résultats étaient inattendus du fait de la corrélation inverse avec les sous-types génétiques favorables.

Dans cette étude, nous montrons pour la première fois, que les antigènes embryonnaires habituellement trouvés dans les cellules souches embryonnaires et les cellules germinales tumorales, sont détectés dans les cellules leucémiques. Le rôle d'OCT4, NANOG et SOX2 a besoin d'être approfondi, afin de savoir s'ils ont un rôle fonctionnel direct dans la LAM ou s'ils sont seulement une conséquence de la différenciation anormale observée dans cette maladie. Cependant, peu importe leur rôle, la différence d'expression des antigènes embryonnaires au diagnostic et lors d'une rémission, montrerait que ces marqueurs sont intéressants pour l'évaluation de la maladie résiduelle, afin d'identifier les cellules souches leucémiques résiduelles et évaluer les traitements.

Expression of embryonic stem cell markers in acute myeloid leukemia

Tumor Biology
July 2017: 1–9
© The Author(s) 2017
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1010428317716629
journals.sagepub.com/home/tub


**Tiphanie Picot^{1,2}, Carmen Mariana Aanei^{1,2},
Amandine Fayard³, Pascale Flandrin-Gresta^{1,2}, Sylvie Tondeur^{1,2},
Marina Gouttenoire³, Emmanuelle Tavernier-Tardy^{2,3},
Eric Wattel², Denis Guyotat^{2,3} and Lydia Campos^{1,2}**

Abstract

Acute myeloid leukemia is driven by leukemic stem cells which can be identified by cross lineage expression or arrest of differentiation compared to normal hematopoietic stem cells. Self-renewal and lack of differentiation are also features of stem cells and have been associated with the expression of embryonic genes. The aim of our study was to evaluate the expression of embryonic antigens (OCT4, NANOG, SOX2, SSEA1, SSEA3) in hematopoietic stem cell subsets (CD34⁺CD38⁻ and CD34⁺CD38⁺) from normal bone marrows and in samples from acute myeloid leukemia patients. We observed an upregulation of the transcription factors OCT4 and SOX2 in leukemic cells as compared to normal cells. Conversely, SSEA1 protein was downregulated in leukemic cells. The expression of OCT4, SOX2, and SSEA3 was higher in CD34⁺CD38⁻ than in CD34⁺CD38⁺ subsets in leukemic cells. There was no correlation with biological characteristics of the leukemia. We evaluated the prognostic value of marker expression in 69 patients who received an intensive treatment. The rate of complete remission was not influenced by the level of expression of markers. Overall survival was significantly better for patients with high SOX2 levels, which was unexpected because of the inverse correlation with favorable genetic subtypes. These results prompt us to evaluate the potential role of these markers in leukemogenesis and to test their relevance for better leukemic stem cell identification.

Keywords

Acute myeloid leukemia, embryonic antigens, leukemic cells, hematopoietic cells, aberrant expression

Date received: 2 May 2017; accepted: 30 May 2017

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is characterized by the expansion and resistance to apoptosis of myeloid cells blocked in early stages of differentiation.¹ AML is a heterogeneous disease arising as a consequence of molecular events implicating genes controlling cell proliferation, differentiation, and epigenetics that cooperate to promote the leukemic clone.² The capacity to initiate and maintain leukemia, at least in vitro and in xenotransplant models, is however limited to a fraction of the leukemic population, termed leukemic stem cells (LSCs), which retains or reacquires self-renewing properties, as well as the capacity to remain in a poorly differentiated stage.^{3–5} LSC persistence is probably the main source of relapse in patients in complete remission (CR) after induction treatment. Indeed,

there is a strong correlation between the proportion of LSC at diagnosis and in remission and the risk of relapse and death from leukemia.⁶

The first studies defined the phenotype of both hematopoietic stem cells (HSCs) and LSCs with the differentiation

¹Laboratoire d'Hématologie, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

²UMR 5239, Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule, Lyon, France

³Département d'Hématologie, Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth, Saint-Priest-en-Jarez, France

Corresponding author:

Lydia Campos, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 2, France.
Email: lydia.campos@chu-st-etienne.fr



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

markers CD45^{dim}, CD34, and CD38, as CD34⁺CD38⁻.^{4,5,7} Additional markers have been investigated to specifically identify LSCs, such as lectin-like C-like molecule-1 (CLL-1) or aberrant expression of lineage markers (CD19⁺, CD33⁻, CD7⁺, CD56⁺).^{8–10} More complex combinations of normal and aberrant expression of differentiation antigens have been proposed recently (HLA-DR⁻, CD123⁺, CD133⁺, CD44⁺, CD96⁺, CD90⁺).^{11–13} However, the nature of LSC is still controversial. Other studies show that leukemia may arise at the early progenitor level rather than at HSC level.¹⁴ This raises the hypothesis of the reacquisition by more mature cells of self-renewal and cell proliferation properties in order to maintain long-term leukemic hematopoiesis.

Embryonic stem cells exhibit characteristics of self-renewal, arrest of differentiation, and pluripotency. The genes controlling these properties have been recently identified. They encode a variety of transcription factors (OCT4, the product of *POU5F1*, SOX2, and NANOG) and surface markers (SSEA1 also called CD15,¹⁵ the product of *FUT4* and SSEA3) whose overexpression has been proved to be able to restore pluripotency in mouse and human somatic cells. Takahashi and Yamanaka¹⁶ reported that the overexpression of a cocktail of four transcription factors (OCT4, SOX2, c-Myc, and KLF4) in adult fibroblasts induces a pluripotent state. C-Myc and KLF4 act as oncogenes and are also involved in somatic cell reprogramming into pluripotency.¹⁷ Taken together, these experiments reveal the ability of somatic cells to reacquire pluripotency and other characteristics of stemness. Thus, it may be hypothesized that alterations in the expression of one or more of these genes could contribute to transformation of normal cells into malignant somatic cells carrying tumor-forming capacities.

The aim of our study was to compare the embryonic stem cell antigen (ESCA; OCT4, NANOG, SOX2, SSEA1 and SSEA3) expression in leukemic versus normal marrow cells and to investigate correlations with biological and clinical characteristics.

Materials and methods

Cell lines

The ESCA expression was investigated in eight human-derived cell lines: NTERA-2, derived from an embryonic carcinoma as positive control; KG1a (poorly differentiated AML); HL60 (AML with promyelocytic differentiation); NB4 (promyelocytic AML with PML-RAR α fusion gene); KASUMI (AML with t(8;21) and RUNX1-RUNX1T1 fusion gene); ME-1 (AML with inv(16) and CBF β -MYH11 fusion gene); THP-1 (monoblastic cell line); and U937 (derived from a histiocytic lymphoma). NTERA-2, KG1a, HL60, THP-1, and U937 cell lines were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, USA); NB4, KASUMI, and ME-1 were from

Leibniz-Institut DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. HL60, KG1a, THP-1, U937, KASUMI, and ME-1 lines were cultured in RPMI-1640 medium (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Eurobio) or 20% for ME-1. The NTERA-2 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 10% FBS. The NB4 cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (ISCOVE) (Sigma-Aldrich) with 10% FBS. Experiments were performed during the exponential growth phase.

Primary AML cells

AML cells from 103 consecutive patients referred to the Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth, Saint-Priest-en-Jarez, France were collected at diagnosis. Patients were aged 3 to 88 years (median 69 years). All patients or their tutor gave written informed consent according to institutional procedure.

The diagnoses were AML with a t(15; 17) and PML-RAR α fusion gene in eight cases, AML with inv(16) and CBF β -MYH11 fusion gene in six cases, AML with t(8; 21) and RUNX1-RUNX1T1 fusion gene in three cases. The karyotype was normal in 44 patients and complex in 42 patients.

In addition, 40 samples harvested after induction treatment from patients in complete cytological remission were studied. Overall, 10 normal bone marrows (BMs) obtained from healthy donors for allogeneic BM transplantation were processed in the same conditions in order to set a control group.

Flow cytometry

Samples. Before staining, for NTERA-2, cells were detached with Trypsine/Vers ne (EDTA; Eurobio) for 3 min. For primary leukemic cells and normal marrows, erythrocytes were lysed with fluorescence-activated cell sorting (FACS) lysing solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Then, 10⁶ cells were incubated with a combination of antibodies (Table 1) with surface antigen (human leukocyte differentiation antigen) and two ESCA (SSEA1 and SSEA3) for 15 min at room temperature, sheltered from light. For intracellular antigen studies (NANOG, OCT4, and SOX2), cells were fixed (BD Cytotfix Fixation Buffer; BD Biosciences), permeabilized with a solution of PermWash Buffer (BD Perm/Wash Buffer; BD Biosciences), and incubated with the antibody for 20 min at room temperature in the dark. Three isoforms of OCT4 have been described (OCT4A, OCT4B, and OCT4B1).¹⁸ These variants are reported to be stem cell-specific but only OCT4A can be directly functionally linked to pluripotency.¹⁹ We used the clone to OCT4 which recognizes isoforms A and B.

Table 1. MFC antibodies used.

Antibodies	Supplier	Clone	Fluorochrome	Concentration
Mouse anti-HLA-DR	BioLegend (San Diego, CA, USA)	L243	Pacific blue	0.5 µg/100 µL
Mouse anti-CD45	BD Horizon (San Jose, CA, USA)	HI30	V-500	1 µg/100 µL
Mouse anti-CD38	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)		APC-H7	5 µg/100 µL
Mouse anti-CD34	BD Biosciences		PerCp-Cy5.5	5 µg/100 µL
Mouse anti-CD90	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)		PE	1.25 µg/100 µL
Mouse anti-CD123	MACS Miltenyi Biotec (Bergisch, Germany)		FITC	0.6 µg/100 µL
Mouse anti-CD117	BD Biosciences	104-D2	Pe-Cy7	2.5 µg/100 µL
Mouse anti-CD133/1	MACS Miltenyi Biotec	AC133	APC	2.5 µg/100 µL
Mouse anti-SSEA1	BD Pharmingen (San Jose, CA, USA)	MC480	FITC	20 µg/100 µL
Mouse anti-SSEA3	BD Pharmingen	MC-631	FITC	20 µg/100 µL
Mouse anti-NANOG	BD Pharmingen	N31-355	Alexa Fluor 488	20 µg/100 µL
Mouse anti-SOX2	BD Pharmingen	245610	Alexa Fluor 647	20 µg/100 µL
Mouse anti-OCT3/4	BD Pharmingen	40/OCT-3	Alexa Fluor 647	20 µg/100 µL
Mouse IgG1 K isotype control	BD Biosciences	MOPC-21	Alexa Fluor 647	20 µg/100 µL
Mouse IgM K isotype control	BD Biosciences	G155-228	FITC	0.5 mg/mL
Mouse IgG1 K isotype control	BD Biosciences	MOPC-21	Alexa Fluor 488	20 µg/100 µL

MFC: Multicolor Flow Cytometry; PE: phycoerythrin; FITC: fluorescein isothiocyanate; APC: allophycocyanin.

Non-specific binding of antibodies was assessed in initial experiments using an isotype control.²⁰ All isotypes were immunoglobulin (Ig) subtype matched and used at the same protein concentration as the corresponding antibody. Three AML BMs and three normal BMs were studied. Data were acquired using a FACSCanto II cytometer and FACS Diva software (BD Biosciences) and analyzed by Infinicyt™ V1.6.0 software (Cytognos, Salamanca, Spain). The cytometer settings were conformed to FranceFlow recommendations and the instrument quality control was checked on a daily basis. The results were expressed as the ratio of mean fluorescence intensities (MFIs) of marker of interest to the MFI of the relevant isotype control.

Analysis strategy. A CD45/SSC-based leucocyte gate was used to discriminate different cell populations. In the CD45^{+/low} compartment, the more mature cells including mastocytes and plasmacytoid dendritic cells were eliminated using HLA-DR, CD117, and CD123 expression. The hematogones were eliminated using SSC^{low} FSC^{low} and CD38^{+/high}. The rest of cells were separated into three subpopulations: CD34⁺CD38^{-/low}, CD34⁺CD38⁺, and CD34⁺CD38^{+/low} cells. Inside the CD34⁺CD38^{-/low} population, CD90 allowed the identification of the committed primitive lineage HSC/progenitor cell subpopulation.

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Total ribonucleic acid (RNA) from cell lines, 16 leukemic samples (4 with t(8;21), 4 with inv(16), 4 with t(15;17), and 4 with normal karyotype) and 4 normal bone marrow mononuclear cells (MNCs), was extracted using a chloroform phenol extraction method. For each sample, 1 µg

RNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA). The primers were obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA; Table 2). The *HMB* gene was used as an endogenous control to normalize the expression data. This gene is weakly expressed in stem cells and is adequate for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) studies.²¹ Reactions were run on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with the following settings: 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 50 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The relative gene expression was analyzed using the 2^{-ΔΔCt} method and normalized to the control. Mean data were averaged from triplicates.

Statistical analysis

Two-sided Student's *t* tests (paired when appropriate) were used to compare mean expression levels. Chi-square tests (or Fisher's exact tests when one group included less than 10 units) were used to compare proportions. *p* values below 0.05 were considered to be statistically significant. Survival curves were plotted according to the Kaplan-Meier method. Survival of patient groups was compared using the log-rank test. Analysis and figure plotting were performed with GraphPad Prism5 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Results

Cell lines

ESCA markers were expressed on most cell lines, with variable intensity. With the exception of SSEA1, the highest levels were observed on the control embryonic cell line

Table 2. Primers used for quantitative RT-PCR (TaqMan gene expression assay).

Gene symbol	Gene description	Assay ID	Amplicon length (bp)
HMBS	hydroxymethylbilane synthase	Hs00609296_g1	69
POU5F1	POU class 5 homeobox 1	Hs00999632_g1	77
NANOG	Nanog homeobox	Hs04399610_g1	101
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	Hs01053049_s1	91
FUT4	Fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)	Hs01106466_s1	152

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction.

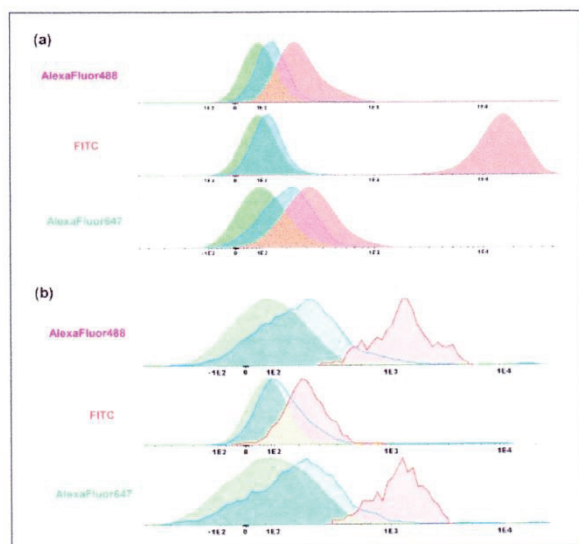


Figure 1. Fluorescence differences between lymphocytes, isotype controls, and conjugated antibody. (a) Comparison between lymphocyte cell population (green), CD45^{low} population stained with isotype controls (blue), and CD45^{low} population stained with conjugated antibody (red; Alexa Fluor 488 Mouse Anti-Human NANOG, FITC Mouse Anti-Human SSEA1, and Alexa Fluor 647 Anti-Human SOX2, respectively) in normal BM. (b) Comparison between lymphocyte cell population (green), CD45^{low} population stained with isotype controls (blue), and CD45^{low} population stained with conjugated antibody (red; Alexa Fluor 488 Mouse Anti-Human NANOG, FITC Mouse Anti-Human SSEA1, and Alexa Fluor 647 Anti-Human SOX2, respectively) in AML BM. SSEA1 was positive in (a) normal cells; NANOG and SOX2 were positive in (b) leukemic cells.

NTERA-2. High levels of all five embryonic markers were noted on KG1a and HL60, while lower levels were observed on lines harboring recurrent genetic anomalies such as NB4 (PML/RAR α rearrangement), KASUMI, and ME-1 (CBF rearrangement). Monocytic lines (THP-1 and U937) exhibited intermediate levels for most markers. Detailed results of flow cytometry are presented in supplemented file (Table S1A).

Flow results were confirmed by qRT-PCR for *POU5F1*, *NANOG*, *SOX2*, and *FUT4* (Table S1B). A majority of cell lines were positive for the genes tested, with $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ranging from 1 to 33.

Normal bone marrow

In flow cytometry, 2 of 10 normal marrow samples were considered positive in the CD34⁺ population for the expression of OCT4, 3 for NANOG, 3 for SOX2, and 5 for SSEA3. The level of expression was always low, with Mean Fluorescence Intensity Ratio (MFIR) ranging from 2.1 to 4. Results were similar for the CD45^{low} (“myeloblast”) population. There was no significant difference between the MFIR of CD34⁺CD38⁻ and CD34⁺CD38⁺ subsets. Concerning neutrophilic polynuclear cells, we observed as expected strong expression for SSEA1/CD15 (MFIR=24).

Initial experiments did not show a difference in threshold positivity whether cells were incubated with the isotype control or not (Figure 1(a)). In addition, we observed that the MFIR of normal lymphocytes (MFIR=1.8) was the same as the MFIR of patient lymphocytes (MFIR=1.7). So, for the rest of the analysis of the study, we used the lymphocytes as a negative control.

Patient cells

We investigated the expression of ESCA in the whole CD45^{low} population and in the more immature subsets CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻. Multicolor Flow Cytometry (MFC) allowed the identification of those subsets. As for normal marrows, initial experiments with isotype control showed that lymphocytes could be used as negative control (Figure 1(b)).

All samples were positive for at least one marker. Overall, OCT4, NANOG, SOX2, SSEA1, and SSEA3 were found positive in the CD34⁺ population in about 36%, 28%, 35%, 40%, and 28% of cases, respectively (Table S2A). The levels of expression were significantly higher in leukemic than in normal cells for all markers except SSEA1 ($p<0.01$ for OCT4, $p<0.001$ for NANOG and SOX2, and $p<0.05$ for SSEA3; Figure 2(a)). The difference was also significant between leukemic and normal cells in the subcompartments CD34⁺CD38⁻CD90⁺ ($p<0.01$ for OCT4 and NANOG and $p<0.05$ for SOX2) (Figure 2(b)). On the contrary, the membrane protein SSEA1 was more expressed in normal CD34⁺CD38⁻CD90⁺ cells (mean MFIR 13.9) as compared to leukemic CD34⁺CD38⁻CD90⁺ cells (mean MFIR 5.8, $p<0.001$; Figure 2(b)). We also evaluated the expression of ESCA in CD90⁺ and CD90⁻ subfractions of immature populations.

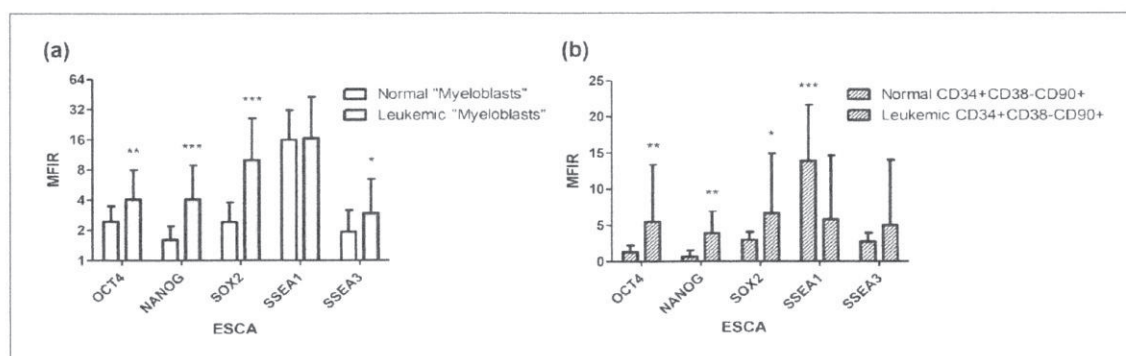


Figure 2. Expression of ESCA in different normal and leukemic compartments. (a) Expression of ESCA in normal and leukemic CD45^{low} compartments. (b) Expression of ESCA in normal and leukemic CD34⁺CD38⁻CD90⁺ subcompartments. Mean fluorescence intensity ratio is expressed as mean $\pm$ SD in 10 controls and 103 AML patients. The expression of ESCA was considered positive when MFIR was ≥ 2 and when 20% of cells at least expressed markers in the target population. Means were compared by Student's t test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$).

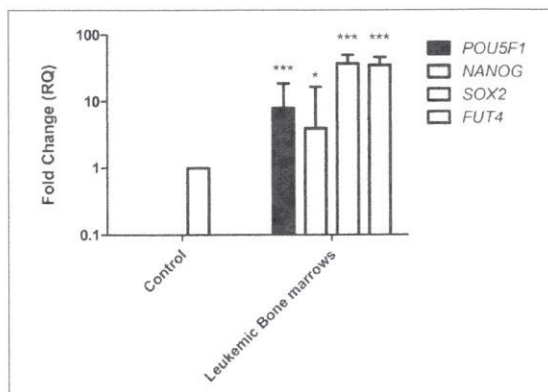


Figure 3. ESCA gene expression analysis by qRT-PCR in bone marrow samples from AML patients versus control subjects. Gene expression of POU5F1, NANOG, SOX2, and FUT4 in leukemic bone marrows versus control. Fold changes in the respective gene expression are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 4$ controls and 16 patients). Student's t test was used to compare mean expression levels (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$).

The specificity of CD90 staining was checked by immunofluorescence on cytopsin sample (data not shown). We did not observe differences in expression of ESCA in the immature (CD34⁺CD38⁻) leukemic subset according to CD90 positivity (Table S2B).

qRT-PCR was performed in 16 leukemic samples for POU5F1, NANOG, SOX2, and FUT4 (Figure 3). The results were positive in most of the cases, with $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ranging from 4 to 37. There was a good correlation between positivity by qRT-PCR and MFC for markers OCT4/POU5F1, NANOG, and SOX2.

Furthermore, differences were observed between leukemias with recurrent molecular subtypes (Table S3). The

expression of SOX2 was higher in leukemias with CBF rearrangements. Likewise, FUT4 levels were higher in AML with CBF rearrangements but not in promyelocytic leukemias. Finally, there was no association between POU5F1 and NANOG expression and any molecular or cytogenetic subtype.

Correlations with biological characteristics

Correlations with other significant clinical or biological features were examined. There was no correlation between the level of any marker MFIR (in blasts or CD34⁺ cells or subsets) and age, sex, World Health Organization (WHO) subtype, white blood cell counts, and marrow blast percentages. There was no correlation also between the percentage of CD34⁺ cells and the expression of ESCA in CD45^{low} cells.

Prognosis

The prognostic value of ESCA expression was investigated in 69 patients treated by intensive chemotherapy. Overall, 29 patients aged 18–60 years were treated according to the GOELAMS AML 2006 IR protocol and 32 aged 61–75 years were treated according to GOELAMS LAM SA 2007 protocol. Eight patients with promyelocytic leukemias received the APL 2006 protocol.²³

CR was obtained in 100% (29/29) of younger patients and 59% (19/32) of older patients with non-promyelocytic leukemias and in 100% (8/8) of promyelocytic leukemias. This rate was not different according to the expression of any embryonic marker in CD34⁺ or CD45^{low} cells (considered as positive or negative). Overall survival was not different, except for SOX2 which was associated with a better prognosis in SOX2-positive patients (Figure 4).

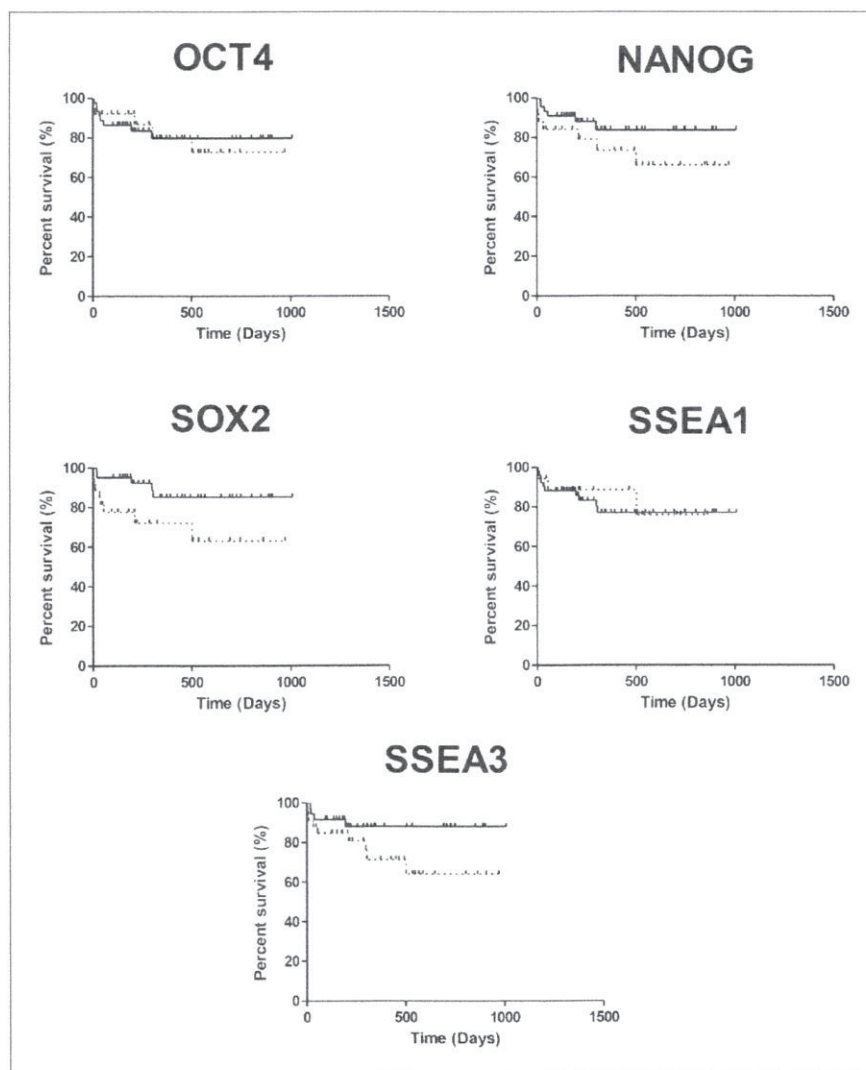


Figure 4. Kaplan–Meier survival analysis. Kaplan–Meier plot representing the overall survival for treated AML patients and the correlation between ESCA expression and survival (OCT4 ($p=0.8$), NANOG ($p=0.2$), SOX2 ($p=0.03$), SSEA1 ($p=0.7$), and SSEA3 ($p=0.2$)). Patients with high antigen expression had longer survival time than those with low expression. For Kaplan–Meier plots, the log-rank test was applied. Solid lines were corresponding to 20% or more of positive cells and dashed lines were corresponding to less than 20% of positive cells.

Expression in remission

In total, 40 patients were studied after induction treatment. Regarding patients in CR, the levels of all ESCA markers, except SSEA3, were significantly different from those measured at diagnosis and were within the range of those observed in control marrows (Figure 5). The difference was particularly striking for OCT4, NANOG, and SOX2.

Discussion

In this article, we show, on a large series of AML patients, that proteins usually found in embryonic stem cells and germ cell tumors are detected on the surface of or within

leukemic cells. The reexpression of embryonic antigens has been previously shown in solid tumours.^{24–26} Regarding hematological malignancies, fewer data are available, mainly in limited series of patients. The expression of OCT4, NANOG, and SOX2 has been investigated by qRT-PCR and immunofluorescence in leukemic cell lines. These transcription factors may be implicated in the pathogenesis of MLL/AF9 leukemias.²⁷ KLF overexpression has also been observed in hematological cancers (acute lymphoblastic leukemia, hairy cell leukemia, multiple myeloma).²⁸ Recently, Yin et al.²⁹ described a high expression of OCT4 by quantitative PCR (qPCR) in a series of 87 AML patients. By flow cytometry, we observed the expression of ESCA markers in all hematopoietic cell lines and in

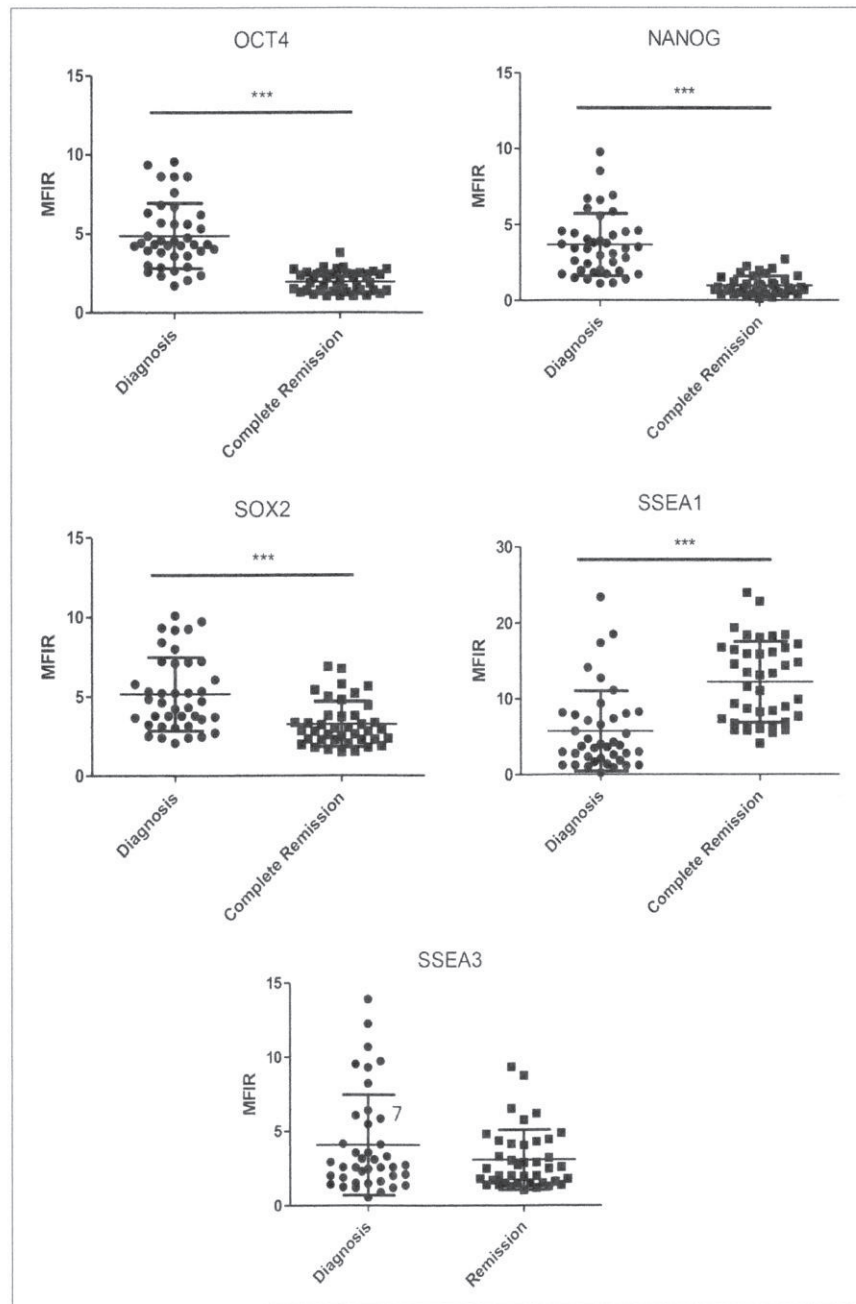


Figure 5. Evaluation of ESCA expression by MFC during remission. Mean fluorescence intensity ratio of ESCA in leukemic CD34⁺CD38⁻CD90⁻ compartment by MFC (n=40 patients in complete remission). The expression of ESCA was considered positive when MFIR was ≥ 2 and when 20% of cells at least expressed markers in the target population. Means were compared by Student's t test (***) ($p < 0.001$).

leukemic cells of most patients, regardless of the type of AML. OCT4 expression was higher in less differentiated leukemias, while SSEA1 levels were higher on more differentiated subtypes, which is consistent with the steady expression of this receptor along with myeloid differentiation, and on granulocytes. Gene expression was also

assessed by qRT-PCR in cell lines and in some fresh leukemia samples with similar results. On the contrary, we found very low levels in normal hematopoietic cells.

MFC allowed identification of specific subpopulations. In leukemic cells, the expression of OCT4, NANOG, SOX2, and SSEA3 was significantly higher in the immature

CD34⁺CD38⁻CD90⁻ compartment than in the more mature CD34⁺CD38⁺CD90⁻ compartment. In contrast, we observed a lower expression of membrane protein SSEA1 in all leukemic compartments. This suggests that OCT4, NANOG, SOX2, and SSEA3 could be markers of leukemic stemness. However, our results appear to be in contradiction with those obtained by gene expression profiling. Gentles et al.³⁰ described a LSC expression signature based on 52 genes, which did not include the genes in our report. These discrepancies may have different explanations: first, the “stem cell” population, although it was defined by the same markers (CD34⁺CD38⁻), it was not isolated by the same technique (cell sorting versus gating in MFC). Second, the study by gene profiling evaluated a limited number of cases (n=7) which can lead to sample variation. Third, the CD34⁺CD38⁻ population is heterogeneous and may not be representative of the “true” LSC. Experiments of xenotransplant with leukemic cell populations sorted on the expression of embryonic markers would be necessary to solve this issue.

The role of ESCA in leukemogenesis remains to be investigated. OCT4 and SOX2 are two of the Yamanaka's factors, which can transform differentiated cells into pluripotent stem cells with embryonic properties.¹⁶ OCT4 is necessary for self-renewal, pluripotency, and maintenance of undifferentiation.^{31–35} The forced expression of OCT4 transdifferentiates skin fibroblasts into hematopoietic cells without going through a stage of embryonic stem cells.³⁶ NANOG and SOX2 also promote self-renewal and maintain pluripotency of ESCA. Eberle et al.³⁷ hypothesized that the transcriptional activation of NANOG2 would induce the stemness in leukemic cells with MLL rearrangements. Although it has been demonstrated that each of these transcription factors have a specific role, NANOG, OCT4, and SOX2 cooperate to maintain stemness and pluripotency of embryonic cells.^{34,38} SSEA1 and SSEA3 are receptors expressed by embryonic stem cells and play a major role in embryonic development.^{39,40} However, SSEA1 is also present in differentiated cells,¹⁵ while SSEA3 expression is restricted to the primitive stages of differentiation.⁴¹

The presence of embryonic antigens in solid tumors is often associated with poor prognosis.^{24–26} We did not observe a prognostic role for high expression of ESCA, with the exception of SOX2 which was unexpectedly associated with a better survival. SOX2 levels were higher in CBF leukemias, a subtype of better prognosis when treated with high-dose cytarabine. In a series of 87 AML patients, Yin et al.²⁹ showed a trend for better overall survival in younger patients without OCT4 high expression (assessed by qPCR) but no significant effect on survival of the total population or on CR rates. AML is a very heterogeneous disease, and prognosis is mainly driven by cytogenetics and molecular characteristics. Larger series would be necessary to further investigate by multivariate analysis the prognostic value of ESCA expression in each AML

subtype. On the contrary, we are investigating the value of ESCA combined with other aberrant markers to assess minimal residual disease (MRD). This evaluation relies mainly on the identification of aberrant phenotypes to discriminate leukemic cells from their normal counterpart. Our preliminary data show that the expression of most embryonic markers is significantly different at diagnosis and in remission. Therefore, the addition of novel markers to MRD assessment panels could help identifying those residual leukemic cells in remission.

In conclusion, we present here evidence that proteins that maintain stemness in embryonic cells are expressed in AML cells, particularly in the less differentiated subset of the leukemic population. The role of OCT4, NANOG, and SOX2 needs to be investigated in this context in order to know whether they are directly implicated in oncogenesis or are only a consequence of an abnormal differentiation pattern. These markers may be useful for the identification of residual leukemic cells and assessment of treatments.

Acknowledgements

The authors thank the association “Les Amis de Rémi” for their financial support and BD Biosciences for providing monoclonal antibodies.

Ethical approval

All patients or their tutor gave written informed consent according to institutional procedure.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

1. Dick JE. Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1044: 1–5.
2. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013; 368: 2059–2074.
3. Bonnet D and Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730–737.
4. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645–648.
5. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 2008; 112: 4793–4807.
6. Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, et al. Leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2014; 9: e107587.
7. Feuring-Buske M and Hogge DE. Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34(+) subtype.

- CD38(-) progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 3882–3889.
8. Van Rhenen A, Moshaver B, Kelder A, et al. Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia* 2007; 21: 1700–1707.
 9. Van Rhenen A, van Dongen Guus AMS, Kelder A, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood* 2007; 110: 2659–2666.
 10. Bakker AB, van den Oudenrijn S, Bakker AQ, et al. C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2004; 64: 8443–8450.
 11. Moshaver B, van Rhenen A, Kelder A, et al. Identification of a small subpopulation of candidate leukemia-initiating cells in the side population of patients with acute myeloid leukemia. *Stem Cells* 2008; 26: 3059–3067.
 12. Hwang K, Park CJ, Jang S, et al. Flow cytometric quantification and immunophenotyping of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2012; 91: 1541–1546.
 13. Knapp DJ, Hammond CA, Aghacepour N, et al. Distinct signaling programs control human hematopoietic stem cell survival and proliferation. *Blood* 2016; 129: 307–318.
 14. Jordan CT. The leukemic stem cell. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 13–18.
 15. Nakayama F, Nishihara S, Iwasaki H, et al. CD15 expression in mature granulocytes is determined by α 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by α 1,3-fucosyltransferase IV. *J Biol Chem* 2001; 276: 16100–16106.
 16. Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–676.
 17. Geoghegan E and Byrnes L. Mouse induced pluripotent stem cells. *Int J Dev Biol* 2008; 52: 1015–1022.
 18. Wang X and Dai J. Concise review: Isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells* 2010; 28: 885–893.
 19. Rijlaarsdam MA, van Herk HADM, Gillis AJM, et al. Specific detection of OCT3/4 isoform A/B/B1 expression in solid (germ cell) tumours and cell lines: confirmation of OCT3/4 specificity for germ cell tumours. *Br J Cancer* 2011; 105: 854–863.
 20. Hughes OR, Stewart R, Dimmick I, et al. A critical appraisal of factors affecting the accuracy of results obtained when using flow cytometry in stem cell investigations: where do you put your gates? *Cytometry Part A* 2009; 75A: 803–810.
 21. Lemma S, Avnet S, Salerno M, et al. Identification and validation of housekeeping genes for gene expression analysis of cancer stem cells. *PLoS One* 2016; 11: e0149481.
 22. Delaunay J, Recher C, Pigneux A, et al. Addition of gemtuzumab ozogamycin to chemotherapy improves event-free survival but not overall survival of AML patients with intermediate cytogenetics not eligible for allogeneic transplantation. Results of the GOELAMS AML 2006 IR study. *Blood* 2011; 118: 79.
 23. Pigneux A, Recher C, Bene MC, et al. Addition of lomustine (CCNU) to induction and post-remission chemotherapy for fit elderly AML patients without unfavorable cytogenetics: results of the Lamsa-2007 Goelams trial. *Blood* 2015; 126: 3736.
 24. Habu N, Imanishi Y, Kameyama K, et al. Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2015; 15: 730.
 25. Amaya CN and Bryan BA. Enrichment of the embryonic stem cell reprogramming factors Oct4, Nanog, Myc, and Sox2 in benign and malignant vascular tumors. *BMC Clin Pathol* 2015; 15: 18.
 26. Wang Q, He W, Lu C, et al. Oct3/4 and Sox2 are significantly associated with an unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2009; 29: 1233–1241.
 27. Liu Y, Cheng H, Gao S, et al. Reprogramming of MLL-AF9 leukemia cells into pluripotent stem cells. *Leukemia* 2014; 28: 1071–1080.
 28. Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, et al. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 383: 157–162.
 29. Yin JY, Tang Q, Zhai LL, et al. High expression of OCT4 is frequent and may cause undesirable treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Tumour Biol* 2015; 12: 9711–9716.
 30. Gentles AJ, Plevritis SK, Majeti R, et al. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA* 2010; 304: 2706–2715.
 31. Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 2001; 26: 137–148.
 32. Pesce M and Schöler HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 2001; 19: 271–278.
 33. Shin DM, Zuba-Surma EK, Wu W, et al. Novel epigenetic mechanisms that control pluripotency and quiescence of adult bone marrow-derived Oct4(+) very small embryonic-like stem cells. *Leukemia* 2009; 23: 2042–2051.
 34. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947–956.
 35. Zhang X, Zhang J, Wang T, et al. Esrrb activates Oct4 transcription and sustains self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 35825–35833.
 36. Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 2010; 468: 521–526.
 37. Eberle I, Pless B, Braun M, et al. Transcriptional properties of human *NANOG1* and *NANOG2* in acute leukemic cells. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 5384–5395.
 38. Loh YH, Wu Q, Chew JL, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; 38: 431–440.
 39. Kucia M, Reza R, Campbell FR, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; 20: 857–869.
 40. Werbowetski-Ogilvie TE, Bossé M and Stewart M. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 91–97.
 41. Enver T, Soneji S, Joshi C, et al. Cellular differentiation hierarchies in normal and culture-adapted human embryonic stem cells. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3129–3140.

Article 2

Potentiel Role of OCT4 in leukemogenesis

Picot T, Kesr S, Wu Y, Aanei C, Flandrin-Gresta P, Tondeur S, Tavernier-Tardy E, Wattel E, Guyotat D, Campos L

In Press à Stem Cells & Development

Ces résultats ont fait l'objet de trois Communications Orales et de deux Présentations Poster.

Picot T., Fayard A., Aanei C., Tavernier-Tardy E., Flandrin-Gresta P., Tondeur S., Gouttenoire M., Wattel E., Guyotat D., Campos-Catafal L. La forte expression du facteur de transcription OCT4 est associée à des anomalies de différenciation dans la Leucémie Aiguë Myéloïde et les Syndromes Myélodysplasiques. **Groupe Francophone des Myélodysplasies**, Hôpital Cochin, Paris, 15 Juin 2017. **Présentation orale.**

Picot T., Fayard A., Aanei C., Kesr S., Wu Y., Tavernier-Tardy E., Flandrin-Gresta P., Tondeur S., Gouttenoire M., Wattel E., Guyotat D., Campos-Catafal L. Forte expression du facteur de transcription OCT4 associée à des anomalies de différenciation dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes et les syndromes Myélodysplasiques. **20^{ème} Congrès Annuel de l'Association Française de Cytométrie (AFC)**, Montpellier, 8-10 Novembre 2016. **Présentation orale et Poster.**

Picot T., Fayard A., Aanei C., Kesr S., Wu Y., Tavernier-Tardy E., Flandrin-Gresta P., Tondeur S., Gouttenoire M., Wattel E., Guyotat D., Campos-Catafal L. High expression of embryonic transcription factor OCT4 associated with differentiation anomalies in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA)**, Edinburgh, Scotland, September 11-14, 2016. **Présentation orale et Poster.**

L'auto-renouvellement et le blocage de la différenciation sont les caractéristiques des cellules souches embryonnaires contrôlées par des facteurs de transcription connus comme les facteurs de « Yamanaka ». La première partie de mon travail a pu montrer que la surexpression des marqueurs embryonnaires apparaît impliquée dans l'arrêt de la différenciation et dans la prolifération anormale qui caractérisent la Leucémie Aiguë Myéloïde. C'est pourquoi, la seconde partie de mon travail a été de voir le rôle fonctionnel que pouvait jouer ces marqueurs embryonnaires dans la Leucémie Aiguë Myéloïde. L'étude

s'est focalisée principalement sur le facteur de transcription OCT4 qui joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire. Dans cette étude, nous avons ainsi testé, après inhibition du gène *POU5F1*, la capacité de différenciation cellulaire, la capacité clonogénique et la prolifération sur différentes lignées cellulaires issues de leucémie aiguë myéloïde et dont certaines possèdent des anomalies génétiques et moléculaires (HL60 : cellules leucémiques à différenciation promyélocytaire, KG1a : cellules de LAM indifférenciée, NB4 : cellules de leucémie aiguë promyélocytaire présentant le gène de fusion PML-RAR α , ME-1 : cellules de LAM présentant le gène de fusion CBF β -MYH11, KASUMI : cellules de LAM présentant le gène de fusion RUNX1-RUNX1T1). L'inhibition a été réalisée par la technique ShRNA qui consiste à éteindre le gène cible *POU5F1* par une interférence de l'ARN à l'aide de petits ARN en épingle à cheveux, qui ont un faible taux de dégradation et une bonne stabilité, par le biais de plasmides bactériens. Les résultats de différenciation avec l'acide *cis-trans* rétinolique montre une diminution de l'expression d'OCT4 dans les cellules leucémiques. De plus, nous avons pu observer que la capacité clonogénique diminuait également dans les cellules différenciées. La sous-régulation d'OCT4 par shRNA a reproduit le même comportement avec une différenciation cellulaire morphologique et phénotype, un arrêt de la prolifération et une diminution du potentiel clonogénique.

Dans cette étude, nous avons ainsi pu montrer la forte implication de la surexpression d'OCT4 dans la Leucémogénèse et plus précisément son rôle fonctionnel sur la prolifération et l'arrêt de la différenciation dans des sous-types spécifiques de leucémie aiguë myéloïde. Tandis que les mécanismes permettant ce phénomène doivent encore être élucidés, ces données peuvent suggérer une utilisation possible d'OCT4 comme cible par de nouvelles thérapies anti-leucémiques.

Potential Role of OCT4 in Leukemogenesis

Tiphanie Picot,^{1,2} Sanae Kesr,^{1,2} Yuenv Wu,^{1,2} Carmen Aanei,^{1,2} Pascale-Flandrin-Gresta,^{1,2}
Sylvie Tondeur,^{1,2} Emmanuelle Tavernier,^{2,3} Eric Wattel,² Denis Guyotat,^{2,3} and Lydia Campos^{1,2}

Embryonic stem cells typically show properties of long-term self-renewal and lack of differentiation. When appropriately stimulated, they are able to differentiate into all cell lineages, and lose their self-renewal characteristics. These properties are controlled by a series of genes encoding several transcription factors, including OCT4, the product of *POU5F1* gene. OCT4 is expressed in germ cell tumors and also aberrantly in cancers developing in differentiated tissues. In a previous study, we observed a high expression of OCT4 in acute myeloid cell lines and primary cells, regardless of the acute myeloid leukemia (AML) subtype. In this study, we investigated the putative oncogenic role of OCT4 in proliferation and differentiation arrest. OCT4 expression was assessed in a panel of myeloid lines, together with clonogenic and proliferation properties, before and after differentiation in the presence of retinoic acid (RA). Same experiments were performed under short hairpin RNA (shRNA)-mediated OCT4 inhibition. In the presence of RA, we observed a decrease of OCT4 expression, associated with a loss of clonogenic and proliferation capacities, cell cycle arrest, and upregulation of p21, in HL60, NB4, KASUMI, and Me-1 cell lines. This effect was absent in the KG1a cell line, which did not differentiate. Downregulation of OCT4 by shRNA resulted in the same pattern of differentiation and loss of proliferation. Although KG1a did not differentiate, a decrease in proliferation was observed. Our findings suggest that OCT4 is implicated in the differentiation arrest at least in some types of AML, and that it also plays a role in cell proliferation through different oncogenic mechanisms. OCT4 might be a potential new target for antileukemic treatments.

Keywords: acute myeloid leukemia, OCT4, leukemic cell lines, differentiation, proliferation, clonogenic capacity, shRNA inhibition

Introduction

ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML) is characterized by the expansion and resistance to apoptosis of poorly differentiated myeloid cells. Long-term propagation of the disease is mainly due to a subset of cells termed leukemic stem cells (LSCs), which reacquire self-renewing properties and give rise to the leukemic clone by abnormal proliferation and arrest of differentiation [1]. Several studies have suggested that LSC mostly belong to the CD34⁺CD38⁻ compartment and represent the malignant counterpart of normal hematopoietic stem or progenitor cells [2]. Self-renewal and lack of differentiation are also features of embryonic stem cells (ESC), controlled by specific transcription factors known as “Yamanaka’s factors,” including OCT4, the product of the *POU5F1* gene. OCT4 can transform differentiated cells into pluripotent stem cells with embryonic properties [3]. Its expression is essential for self-renewal, pluripotency, and maintenance of dedifferentiation [4–7]. Reinduction of

OCT4 expression in skin fibroblasts induces their direct re-differentiation into hematopoietic cells without going through the ESC stage [8]. Moreover, *POU5F1*/OCT4 is also a newly identified proto-oncogene that serves as a marker of aggressive disease. An abnormal expression has been reported in a variety of solid tumors, in which it induces pluripotency and suppresses differentiation [9,10]. A strong expression of OCT4 was observed in recurrent prostate cancer [11]. In patients with head and neck squamous cell carcinoma, increased expression of OCT4, resulting from the activation of the cytoplasmic/nuclear β -catenin pathway, was associated with a worse prognosis [12]. Concerning hematological malignancies, a more limited number of data are available. Yin et al. described a high expression of OCT4 by qPCR in a series of 87 patients with AML at diagnosis [13], with a trend for worse prognosis in patients exhibiting the highest levels. In a recent study, we have shown by flow cytometry a high expression of ESC markers, including OCT4, in AML at diagnosis. OCT4 levels were higher in the

¹Laboratoire d’Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France.

²Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule, UMR 5239, Lyon, France.

³Département d’Hématologie et Thérapie Cellulaire, Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth, Saint-Etienne, France.

TABLE 1. MFC ANTIBODIES

Antibodies	Supplier	Clone	Fluorochrome	Concentration
Mouse anti-CD11b	BD Biosciences (CA)	ICRF44	Alexa Fluor 647	5 µg/100 µL
Mouse anti-CD34	BD Biosciences		PerCp-Cy5.5	5 µg/100 µL
Mouse anti-OCT3/4	BD Pharmingen (CA)	40/OCT-3	PE	20 µg/100 µL
Mouse IgG1 κ Isotype control	BD Biosciences	MOPC-21	PE	20 µg/100 µL
Mouse IgG1 κ Isotype control	BD Biosciences	MOPC-21	Alexa Fluor 647	5 µg/100 µL
Mouse IgG1 κ Isotype control	BD Biosciences	MOPC-21	PerCp-Cy5.5	5 µg/100 µL
Ki67	BD Pharmingen		FITC	5 µg/100 µL
Isotype control Mouse IgG1 κ	BD Biosciences	MOPC-21	FITC	20 µg/100 µL
Anti-p21	Clinisciences (Nanterre, France)	WA-1	FITC	20 µg/100 µL

immature leukemic compartment (CD34⁺CD38⁺ cells), which contains LSCs [14]. In the present study, we evaluated the putative role of *POU5F1*/OCT4 in myeloid differentiation, cell proliferation, and clonogenic capacities of OCT4-positive AML cell lines that were selected to represent various stages of differentiation. To this end, we compared the effects of exposure to all-trans retinoic acid (ATRA) to those of OCT4 downregulation by short hairpin RNA (shRNA).

Materials and Methods

Cell lines

HL60, KG1a, KASUMI, and ME-1 human cell lines were cultured in RPMI-1640 medium (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Eurobio) or 20% for Me-1. NB4 was cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (ISCOVE) (Sigma Aldrich, St Louis) supplemented with 10% FBS. Experiments were performed during the exponential growth phase. Cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).

Flow cytometry

Antigen expression. After washing in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% BSA and 0.09% azide (AZ), cells were resuspended in PBS/BSA/AZ. 10⁶ cells were incubated with antibodies to membrane differentiation antigen (CD34 and CD11b) for 15 min at room temperature, in the dark. For intracellular staining of OCT4, cells were then fixed (BD Cytotix Fixation Buffer; BD Biosciences, San Jose), permeabilized with a solution of PermWash Buffer (BD Perm/Wash Buffer; BD Biosciences), and incubated with the antibody for 20 min at room temperature in the dark. Three isoforms of OCT4 have been described (OCT4A, OCT4B, and OCT4B1) [15]. These variants are reported to be stem-cell specific, but only OCT4A can be directly functionally linked to pluripotency [16]. We used

the 40/OCT3 clone which specifically recognizes OCT4A and OCT4B isoforms. Finally, cells were resuspended in PBS/BSA/AZ before flow cytometry analysis.

Nonspecific binding of antibodies was assessed in experiments using an isotype control. Details of antibodies (sources, clones, fluorochromes) are detailed in Table 1.

Samples were acquired on a FACSCanto II cytometer (Beckton Dickinson [BD Biosciences]) and FACSDiva software version 1.7 (BD Biosciences). Analyses were performed using Infinicyt software version 1.6. (Cytognos, Salamanca, Spain). Doublets and debris were excluded with the window FSC/SSC. 7-AAD (BD Pharmingen, CA) was used to exclude nonviable cells. Results were expressed as the ratio of mean fluorescence intensities (MFIs) of marker of interest to MFI of the relevant isotype control.

Untreated and treated cell analyses were performed on six separate experiments and results are shown as mean ± SD.

Cell cycle. The technique was adapted from the protocol provided by Abcam laboratory (#ab139418; Abcam, Cambridge, UK). In brief, after washing in PBS/BSA/AZ, cells were fixed in 500 µL cold Ethanol 70% during 30 min at 4°C, permeabilized with 100 µL Triton X-100 0.2%, and incubated with the antibodies to p21 and Ki67 for 20 min at 4°C. Finally, cells were resuspended in 250 µL of mix staining (200 µL propidium iodide (PI) (BD Biosciences), 5 mg ribonuclease (Sigma Aldrich), and 10 mL PBS. Annexin-V/PI (BD Pharmingen) staining was performed in parallel to evaluate the percentage of the apoptotic cells.

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to measure the expression levels of *POU5F1*, *NANOG*, *SOX2*, and *CDX2* (Table 2). Total RNA was extracted using a phenol/chloroform extraction method. RNA concentration was determined by spectrophotometry

TABLE 2. PRIMERS USED FOR QUANTITATIVE RT-PCR (TAQMAN GENE EXPRESSION ASSAY)

Gene symbol	Gene description	Assay ID	Amplicon length (bp)
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase	Hs00609296_g1	69
<i>POU5F1</i>	POU class 5 homeobox 1	Hs00999632_g1	77
<i>NANOG</i>	Nanog homeobox	Hs04399610_g1	101
<i>SOX2</i>	SRY (sex determining region Y)-box 2	Hs01053049_s1	91
<i>CDX2</i>	Caudal type homeobox 2	Hs01078080_m1	81

TABLE 3. SHORT HAIRPIN RNA SEQUENCES TARGETING *POU5F1* GENE

Constructs	Sequence
TRCN0000004879	CCGGTCATTCACTAAGGAAGGAATTCTCGAGAATTCCTTCCTTAGTGAATGATTTTT
TRCN0000004880	CCGGCGTAGGTTCTTGAATCCCGAACTCGAGTTCGGGATTCAAGAACCTACGTTTTT
TRCN0000004881	CCGGCCCTCACTTCACTGCACCTGACTCGAGTACAGTGCAGTGAAGTGAGGGTTTTT
TRCN0000004882	CCGGGAGATTGATAAAGTGGTGTGTTCTCGAGAACACACCAGTTATCAATCTCTTTTT
TRCN0000004883	CCGGACTATGCACAACGAGAGGATTCTCGAGAATCCTCTCGTTGTGCATAGTTTTT

using a Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington). RNA integrity was assessed with the Agilent 2100 Bioanalyzer with a RNA 6000 Nano LabChip kit (#5067-1511; Agilent Technologies, CA). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 1 µg of RNA and subjected to quantitative PCR using 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA) with the following settings: 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 50 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Primers were obtained from Applied Biosystems. All reactions were performed in duplicate six times with 20 µL TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) containing 5 µL of cDNA. The *HMBS* gene was used as endogenous control to normalize expression data. This gene has been demonstrated to be weakly expressed in stem cells and is adequate for qRT-PCR studies [17]. The relative gene expression in untreated and treated cells was determined by the comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) method with the software SDS 2.3.

Differentiation

Cells were differentiated using *cis-trans*-retinoic acid (RA) (R4643, 10 mM; Sigma Aldrich) and ATRA (R2625, 10 mM; Sigma Aldrich). To do so, 4×10^6 cells/mL were seeded in T-25 flasks in presence of 80 µL RA (10 µM final concentration) during 7 days at 37°C. After differentiation, we performed flow cytometry and clonogenic assays on untreated cells (control) and treated cells. Differentiation analyses using ATRA and RA were performed on six separate experiments.

Clonogenic assay

Thousand two hundred fifty cells/dish were plated in methylcellulose medium H4434 (StemCell Technologies) and cultured in fully humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C for 15 days. CFU-G colonies for untreated and treated cells were then numbered using inverted microscopy (Zeiss). Clonogenic assays were performed on six separate experiments.

WST-1 assay for cell proliferation

2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST) (Roche Meylan, France) was used for the measurement of cell proliferation [18]. In brief, leukemic cells were seeded at 4×10^3 cells/well in 96-well plates and 10 µL WST was added to each well for subsequent 4 h incubation at 37°C and 5% CO₂. Then, absorbance was recorded at 450 nm using a microplate reader. Results from pure culture medium wells without cell inoculation and untreated cells were respectively used as

blank control and control. Each condition was assayed six times. The cell proliferation percentage in each group (differentiated and inhibited cells) was calculated by comparison to the control (untreated cells).

shRNA vectors and production of viral particles

We used MISSION shRNA strategy from Sigma Aldrich, consisting of bacterial glycerol stock harboring sequence-verified shRNA lentiviral plasmid vectors for human gene *POU5F1* cloned into the pLKO.1-puro vector. For this study, we used mixed viruses containing five shRNA vectors targeting different sites of *POU5F1* gene (SHCLNG-NM_002701) (Table 3). Sequences 4,879 and 4,881 specifically target the isoform B mRNA of *POU5F1* whereas sequences 4,880, 4,882, and 4,883 specifically target the isoform A mRNA of *POU5F1*.

Each MISSION ShRNA clone was cloned within lentivirus plasmid vector, pLKO.1-puro, followed by bacterial transformation into *Escherichia coli*. For the production of viral particles, plasmids were transfected in HEK293 cells and medium supernatants were collected for virus purification by NucleoBond Xtra technology (NucleoBond Xtra Maxi EF, #740424.10; Macherey-Nagel, Düren, Germany). Titration for viral particles was performed using standard methods based on spectrophotometry at 260 nm (Nanodrop ND1000). A MISSION pLKO.1-puro Empty Vector Control Plasmid DNA (#SHC001; Sigma Aldrich) that does not contain shRNA insert was used as control. Functional titer (plaque-forming units) was determined with plaque assay on HEK293 cells.

ShRNA-mediated OCT4 inhibition

Leukemic cells (1×10^5), cultured in serum-free RPMI-1640, were infected with shRNA-containing viral particles targeting OCT4 or SHC001-Control-shRNA at 5 MOI (Multiplicity of Infection, calculated as PFU/cell numbers), in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Medium was removed 8 h later and replaced with fresh RPMI-1640 medium containing 10% FBS. Cells were incubated for another 48 h. Inhibition analyses were performed on six separate experiments.

Western blot analysis

Protein concentration of cell lysates was quantified by the BCA Protein Assay Kit (Pierce). Twenty micrograms of proteins were separated on 4% to 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) (Bio-Rad) and then were transferred into Hybond ECL membrane (GE Healthcare, UK). Membranes were blocked

in TBS with 5% milk and 0.1% Tween-20 in TBS-T buffer for 1 h and then incubated with anti-OCT4 (Cell Signaling Technology) and antiactin antibody (Cell Signaling Technology) for 2 h. After washing, membranes were incubated with anti-mouse or anti-rabbit-HRP secondary antibodies (1:1,000; DAKO, Denmark) for 1 h. Finally, protein-antibody complexes were visualized by an enhanced chemiluminescence detection system (Clarity Western ECL Substrate [Bio-rad]). Signals were quantified by Image J version 1.6.0 software.

Statistical analysis

All data are presented as mean $\pm$ standard error (SD). Statistical significance was determined using *t*-test or analysis of variance (ANOVA) using the GraphPad Prism5 software (GraphPad, CA). $P < 0.05$ was considered as a statistically significant difference.

Results

Decreased OCT4 expression after ATRA differentiation

To evaluate the contribution of OCT4 in restraining LSCs differentiation, we assessed the expression of OCT4 in a panel of AML cell lines following differentiation induction. Differentiation was triggered in HL60, KG1a, NB4, KASUMI, and Me-1 cell lines by either RA (*cis-trans*) or ATRA treatment. Differentiation efficiency was assessed by following the expression of the differentiation marker CD11b by flow cytometry and morphologically by the presence of cytoplasmic grains (Fig. 1A, B). Results obtained with RA were similar to those with ATRA, except for NB4 cell line, for which there was no significant change following RA treatment. Thus, only results with ATRA treatment are presented.

CD11b expression was significantly upregulated in differentiated HL60 ($P < 0.001$), NB4 ($P < 0.01$), KASUMI ($P < 0.05$), and Me-1 ($P < 0.05$) cell lines (Fig. 1B, D). Likewise, CD34 expression was significantly downregulated in differentiated KASUMI ($P < 0.01$) and Me-1 ($P < 0.01$) cell lines whereas it remained negative in differentiated HL60 and NB4, which are CD34-negative cell lines (Fig. 1B, E). By contrast, KG1a cell line did not differentiate as revealed by a low expression of CD11b and high expression of CD34. Interestingly, there was a concomitant significant decrease of the expression of OCT4 after differentiation with RA and ATRA in HL60 ($P < 0.001$), KASUMI ($P < 0.05$), Me-1 ($P < 0.01$), and NB4 ($P < 0.05$ for ATRA only), that was not observed in KG1a (Fig. 2A, C). These results were confirmed by qRT-PCR with a significant decrease of *POU5F1* transcripts in KASUMI ($P < 0.01$), Me-1 ($P < 0.001$), and NB4 ($P < 0.001$), or even undetectable levels in HL60 after ATRA differentiation (Fig. 2B). *CDX2*, a transcription factor which cooperates with OCT4, was similarly downregulated after differentiation (Fig. 2B).

Inhibition of OCT4 by ShRNA confirmed by qRT-PCR and flow cytometry

To substantiate these observations, OCT4 expression was inhibited using a shRNA strategy, and similar experiments

were then performed to test the differentiation potential of the tested cell lines. Knockdown efficiency was assessed by qRT-PCR, MFC, and western blot (Fig. 3). When the shRNA constructs were individually transfected, we could observe variable extent of downregulation of the OCT4 isoforms, at the protein level (Fig. 3F). Therefore, to potentiate the knockdown efficiency, we cotransfected the 5 shRNA constructs. At the mRNA level, *POU5F1* expression was significantly decreased in all cell lines (Fig. 3A). At the protein level, OCT4 expression was also significantly reduced as revealed by flow cytometry ($P < 0.001$ for HL60 and KG1a, $P < 0.01$ for Me-1, and $P < 0.05$ for NB4 and KASUMI) (Fig. 3B) with an OCT4 fluorescence close to isotype control (Fig. 3E) and by western blot analysis (Fig. 3G).

shRNA-mediated OCT4 inhibition was accompanied by a significant increase in CD11b differentiation marker expression for all leukemic cell lines ($P < 0.001$ for HL60 and KG1a and $P < 0.01$ for NB4, KASUMI, and Me-1) and a significant decrease of CD34 as a stem cell marker for three cell lines (KG1a [$P < 0.01$], KASUMI [$P < 0.01$], and Me-1 [$P < 0.01$]) that were initially CD34⁺ (Fig. 3C, D). HL60 and NB4 cell lines that do not express CD34 at the steady state did not show any modified pattern of CD34 level after OCT4 inhibition.

Role of OCT4 in the arrest of differentiation

To further document the role of OCT4 in differentiation, a comparative analysis was done between ATRA differentiation and shRNA-treated cells (Figs. 1A–C, 2 and 3). For HL60, NB4, KASUMI, and Me-1 cell lines, OCT4 inhibition resulted in spontaneous cell differentiation similar to that observed after ATRA exposure. Regarding KG1a cell line, OCT4 inhibition even induced a more pronounced differentiation effect than ATRA with massive decreased expression of CD34 and increased expression of CD11b (CD11b MFIR: 10.2 vs. 1.2, CD34 MFIR: 1.8 vs. 7.4, OCT4 MFIR: 1.9 vs. 9, comparing OCT4shRNA vs. ATRA) (Fig. 3, C, D).

Evaluation of other pluripotency markers, including SOX2 and NANOG, was performed (Fig. 4). mRNA and protein levels of NANOG were not significantly modified in ATRA and OCT4-shRNA groups, compared with the control group (untreated cells). However, we could notice a trend toward a moderate decrease (RQ NANOG ATRA vs. OCT4-shRNA: 0.65 vs. 0.58 for HL60, 0.88 vs. 0.8 for KG1a, 0.69 vs. 0.6 for NB4, 0.55 vs. 0.6 for KASUMI, 0.57 vs. 0.52 for Me-1) (Fig. 4A, C). Same results were observed for SOX2 mRNA and protein expression (RQ SOX2 ATRA vs. OCT4-shRNA: 0.78 vs. 0.7 for HL60, 0.9 vs. 0.87 for KG1a, 0.71 vs. 0.68 for NB4, 0.79 vs. 0.71 for KASUMI, 0.86 vs. 0.75 for Me-1) (Fig. 4B, D). Overexpression of OCT4 caused a negative impact on the differentiation by blocking it in the leukemic cells.

Role of OCT4 in the clonogenic capacity

Given the negative impact of OCT4 on differentiation, we therefore evaluated the role of OCT4 on clonogenicity. Following ATRA differentiation, the yield of CFU-G was significantly decreased ($P < 0.01$ for HL60 and KG1a, $P < 0.05$ for NB4, KASUMI, and Me-1), even in KG1a

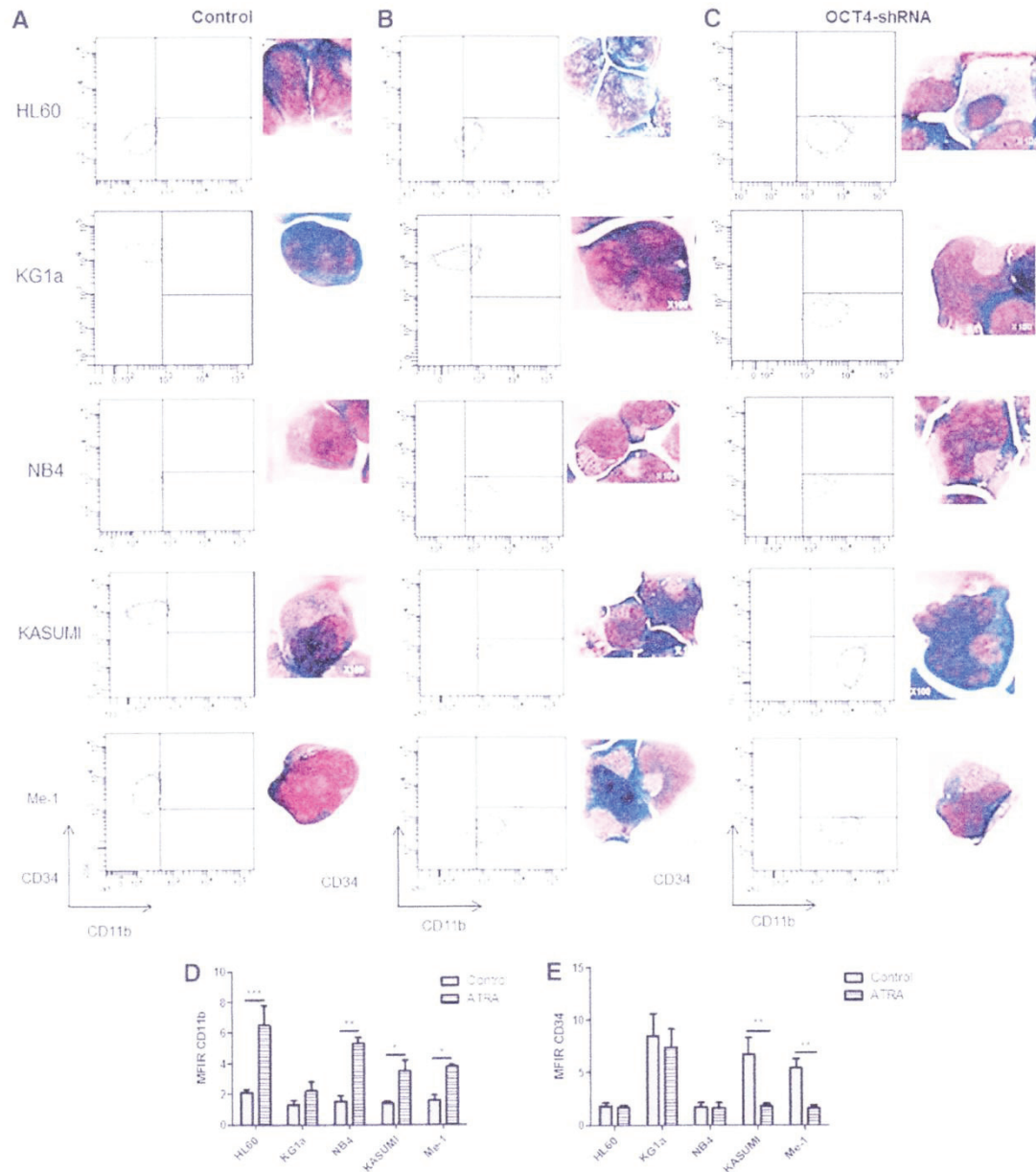


FIG. 1. Evaluation of CD11b and CD34 expression by flow cytometry. Representative flow cytometry diagrams and morphological changes after May-Grünwald-Giemsa coloration in (A) untreated (control) and (B, C) treated (ATRA and OCT4-shRNA) leukemic cell lines. Flow cytometry bar diagram of (D) CD11b and (E) CD34. MFIs ratio is expressed as mean $\pm$ SD of six separate experiments. Student's *t*-test was used to compare mean expression levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. ATRA, all-trans retinoic acid; MFI, mean fluorescence intensity; shRNA, short hairpin RNA.

($P < 0.01$) that did not exhibit a differentiated phenotype upon ATRA treatment (Fig. 5). We obtained comparable results with RA, except for NB4 cell line, for which there was not a significant decrease after RA differentiation. Only results with ATRA treatment were presented (Fig. 5).

In shRNA-treated cells, all cell lines, except NB4, showed a significant reduction of the clonogenic capacity ($< 10,000$ CFU-G for KG1a [$P < 0.01$], KASUMI and ME-1 [$P < 0.05$] and 20,000 CFU-G for HL60 [$P < 0.01$]) (Fig. 5).

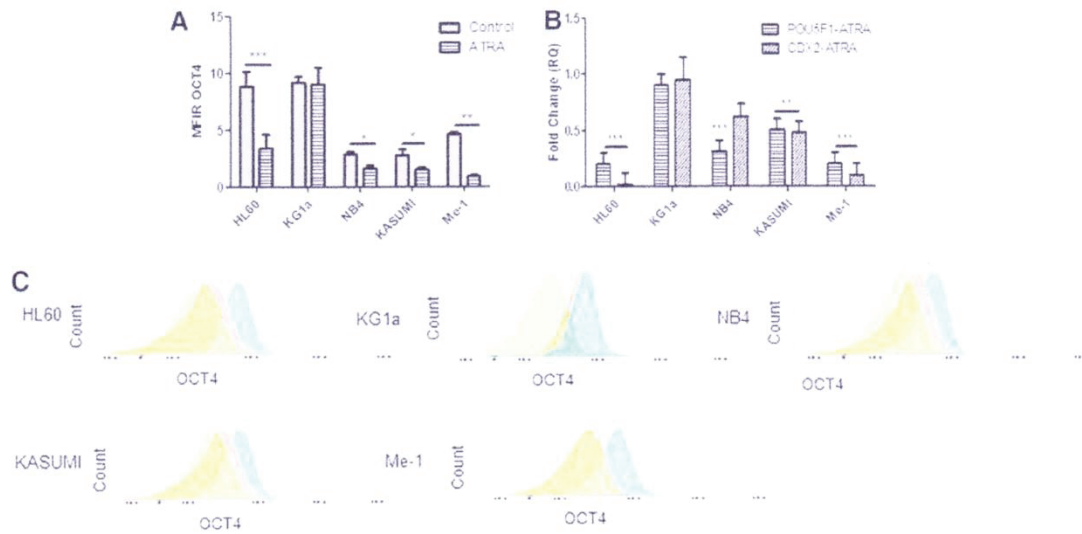


FIG. 2. Evaluation of OCT4/*POU5F1* and *CDX2* expression by flow cytometry and qRT-PCR during differentiation. **(A)** MFIs ratio is expressed as mean $\pm$ SD of six separate experiments. **(B)** Fold Changes in *POU5F1* and *CDX2* genes expression are expressed as mean $\pm$ SD, $n=6$ controls and five sextuplets of cell lines (KG1a=6, HL60=6, NB4=6, KASUMI=6, Me-1=6). **(C)** OCT4 fluorescence differences between isotype control (green), untreated (blue) and treated with ATRA (orange) leukemic cell lines. Student's *t*-test was used to compare mean expression levels. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. qRT-PCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

OCT4 inhibition decreased cell proliferation

Cell proliferation was measured using the WST assay after ATRA differentiation and OCT4 inhibition (Fig. 6A). In both conditions, we could observe a significant decrease of cell proliferation rate in all cell lines ($P<0.001$ for HL60, KASUMI and Me-1, $P<0.01$ for NB4, and $P<0.05$ for KG1a). This effect is even more pronounced in shRNA-treated cells, probably due to a more robust extinction of OCT4 protein by comparison with ATRA treatment. Results with RA and ATRA were identical for all cell lines. Thus, only results with ATRA treatment were presented in Fig. 6. This proliferation arrest was then confirmed by cell cycle analysis (Fig. 6C) showing a decreased Ki67 expression and an elevated percentage of cells in the G0 phase after ATRA or OCT4-shRNA treatments for HL60 cell line compared with untreated cells (G0 phase%: 54.2 for ATRA vs. 59.8 for OCT4-shRNA vs. 38.4 for control cells). This result was observed in all cell lines (KG1a G0 phase%: 49.8 vs. 60.1 vs. 39.2, NB4 G0 phase%: 52.3 vs. 58.7 vs. 35.5, KASUMI G0 phase%: 50.9 vs. 59.9 vs. 40.1, Me-1 G0 phase%: 55.2 vs. 60.2 vs. 37.6, for ATRA vs. OCT4-shRNA vs. control cells, respectively). Annexin V/PI staining was performed in parallel to assess the percentage of apoptotic cells (2%). The proliferation arrest could be discriminated from apoptosis or necrosis as showed by Annexin V and PI staining. At the same time, cell cycle arrest was accompanied by a significant increase in expression of cell cycle regulator p21 in all ATRA or RA differentiated cells ($P<0.05$) and OCT4-shRNA inhibited cells ($P<0.01$ for HL60, KG1a and Me-1, $P<0.05$ for NB4 and KASUMI) (Fig. 6B) compared with control. Over-regulation of the transcription factor OCT4 would promote abnormal cell proliferation in leukemic cells.

Discussion

The processes involved in the arrest of differentiation and cell proliferation observed in AML are not fully understood. One mechanism implicates the aberrant expression of transcription factors, involved in normal hematopoiesis [19]. We and others previously showed that OCT4 is over-expressed in AML cells [13,14]. The highest levels were observed in the immature ($CD34^+CD38^-$) compartment [14]. In addition to differentiation arrest, LSCs also possess the property of self-renewing and are the source of long-term maintenance and propagation of the disease. In the present study, we confirm that OCT4 is expressed in leukemic cell lines exhibiting a variety of oncogenic anomalies and phenotypes. HL-60 (AML with promyelocytic differentiation), NB4 (Promyelocytic AML with PML-RAR α fusion gene), KASUMI [AML with t(8;21) and RUNX1-RUNX1T1 fusion gene], and ME-1 [AML with inv(16) and CBF β -MYH11 fusion gene] correspond to more differentiated leukemia with specific molecular anomalies, with a high differentiation potential in the presence of RA or ATRA, and are derived from AML with favorable prognosis. Conversely, KG1a is a differentiation-resistant subtype of AML without known recurrent oncogenic anomaly. Upon differentiation in presence of ATRA, expression of OCT4 decreased in leukemic cells (Fig. 2). Furthermore, we observed that the clonogenic capacity decreased as well in differentiated cells (Fig. 5). OCT4 downregulation by specific ShRNA reproduced the same behavior with morphological and phenotypic cell differentiation (Figs. 1 and 3) and clonogenic potential (Fig. 5). Interestingly, there was a difference between RA and ATRA for the NB4 cell line, in line with the fact that ATRA is specifically active

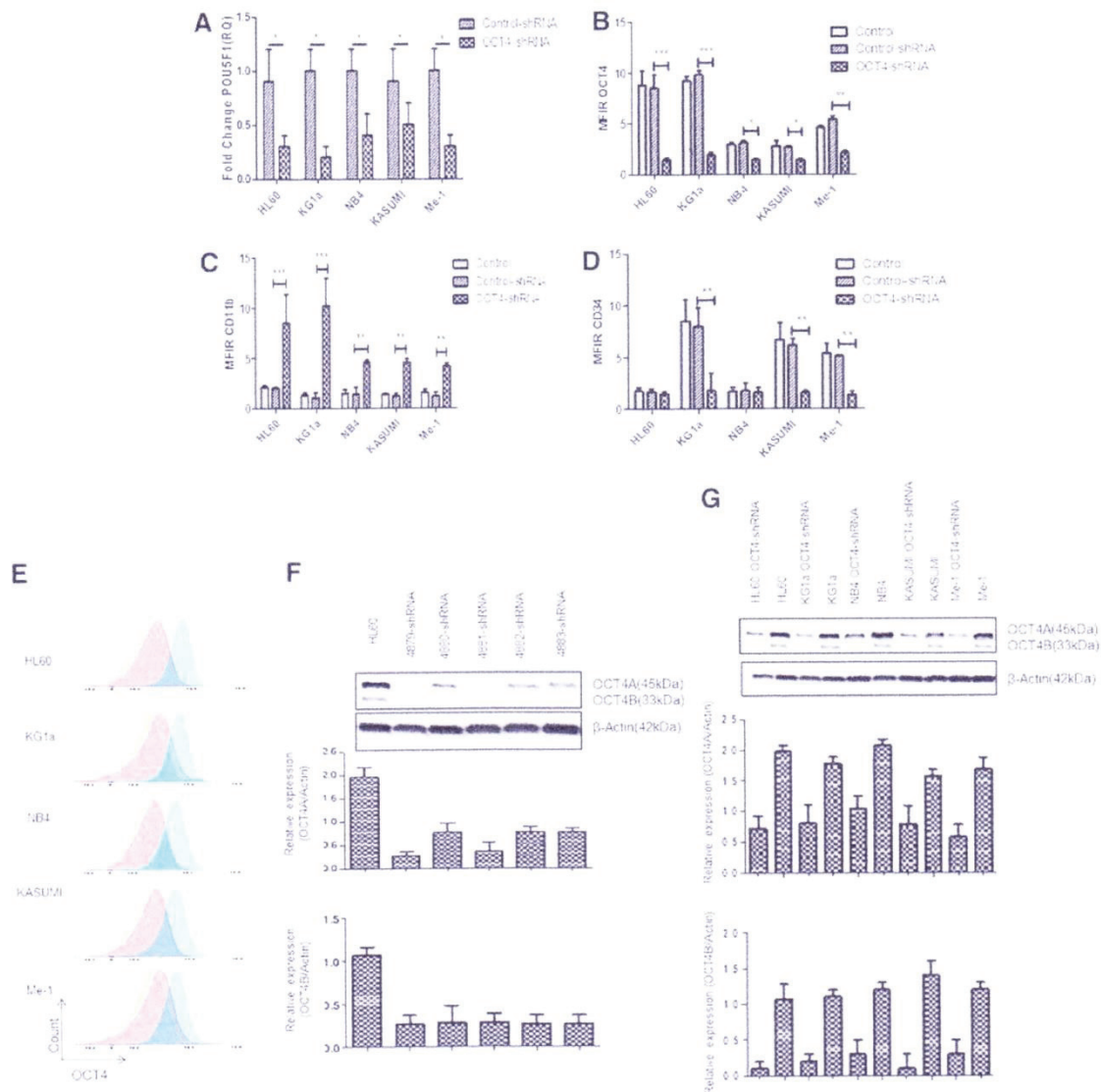
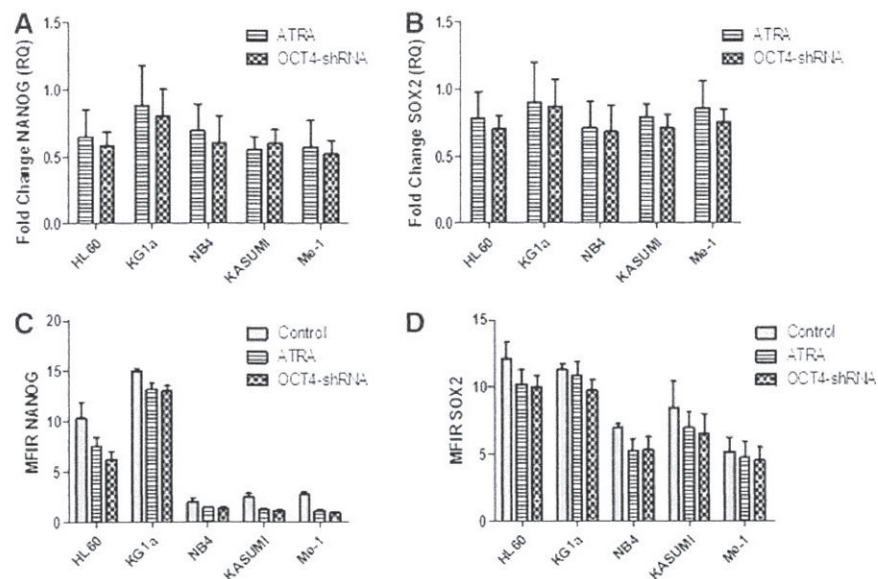


FIG. 3. Evaluation of OCT4/*POU5F1*, CD11b, and CD34 expression by qRT-PCR and MFC after shRNA inhibition. (A) mRNA Fold Changes. (B) MFI ratio of OCT4 (C) CD11b and (D) CD34 by MFC. (E) OCT4 fluorescence differences between isotype control (green), untreated (blue), and treated with OCT4 shRNA (purple) leukemic cell lines. (F) Total OCT4 protein expression in HL60 line of each shRNA (4,879 and 4,881 isoform B, 4,880, 4,882, and 4,883 isoform A) was evaluated by western blot; relative quantification of western blot by densitometry evaluation compared with HL60 control and β -Actin. (G) Total OCT4 protein expression in control and OCT4-shRNA cell lines (cotransfection of the 5 shRNA sequences) was evaluated by western blot; relative quantification of western blot by densitometry compared with untreated cells and β -Actin. All results are expressed as mean $\pm$ SD of six separate experiments. Student's *t*-test was used to compare mean expression levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

on leukemic cells with PML-RAR α rearrangement [20]. Regarding the KG1a cell line, we observed very limited differentiation and loss of proliferation in response to differentiation treatments, and no variation in OCT4 levels. However, OCT4 levels were significantly decreased upon shRNA treatment. This was associated with differentiation

features and loss of clonogenic capacities. These findings suggest that differentiation arrest and proliferation may depend on different underlying mechanism according to the type of leukemia, and also that OCT4 upregulation remains a common phenomenon whatever the initial oncogenic anomaly is.

FIG. 4. Evaluation of NANOG and SOX2 expression by qRT-PCR and MFC after ATRA and OCT4-shRNA treatments. Fold Changes in (A) NANOG and (B) SOX2 genes expression are expressed as mean $\pm$ SD, $n=6$ controls and 5 sextuplets of cell lines (KG1a=6, HL60=6, NB4=6, KASUMI=6, Me-1=6). MFIs for (C) NANOG and (D) SOX2 is expressed as mean $\pm$ SD of six separate experiments. Student's *t*-test was used to compare mean expression levels.



OCT4 downregulation reduced cell proliferation (Fig. 6) by arrest of cell cycle in G1 phase. Differentiated cells after ATRA exposure did not reveal differences in apoptosis levels compared with OCT4-shRNA inhibited cells. The arrest of cell cycle and the decrease of cell proliferation were associated with p21 overexpression. p21 acts as an inhibitor of the cell cycle during G1 phase and is tightly controlled by the tumor suppressor protein p53 [21]. In this study, we found an overexpression of p21 that was associated with proliferation arrest and induction of differentiation. These results are correlated with those of Liu et al. who showed that the overexpression of p21 in human leukemic cells U937 leads to the expression of differentiation markers CD11b and CD14 and the inhibition of cell proliferation [22].

Taken together, our findings suggest a potential role of OCT4 in acute leukemia oncogenesis, as already described in solid tumors. The effect of OCT4 on cancer cell differentiation was previously reported in solid cancers, such as glioma

[23] and epithelial tumors [24]. It was shown that OCT4 forced expression in C6 rat glioma cells increased the self-renewal capacity and promoted an undifferentiated phenotype [23]. In addition, RNA interference of OCT4 reduced tumor-forming capacity in cultured glioma cells [25].

OCT4/*POU5F1* is essential for establishing and maintaining the pluripotent state of stem cells [26,27]. However, the role of OCT4 in the development and progression of malignant tumors has not been fully determined. OCT4 interacts with several signaling pathways that are constitutively activated in AML, such as the MAPK [28,29] and JAK/STAT pathways [30]. Furthermore, OCT4 upregulates the expression of Grb2 associated docking protein (Gab1), which will enable activation of the MAPK pathway. OCT4 also cooperates with the LIF-induced JAK/STAT3 signaling pathway to activate transcription factors Ref1 (redox effector factor-1) and Utf1 (undifferentiated cell transcription factor 1) that are involved in the undifferentiated or pluripotent state of these cells. Finally, OCT4 cooperates with the transcription factor CDX2 in cell differentiation. CDX2 is involved in embryonic development and intestinal cell homeostasis. It is aberrantly expressed in nearly all cases of AML and promotes leukemogenesis, while it is absent in normal hematopoietic stem and progenitor cells [31,32]. Our preliminary data suggest that CDX2 is downregulated together with OCT4 during RA or ATRA differentiation (Fig. 2). We also investigated the role of other embryonic markers. In our study on primary AML cells, we observed a strong expression of NANOG and SOX2 in leukemic cells. OCT4 and SOX2 are two of the Yamanaka's factors, which can transform differentiated cells into pluripotent stem cells with embryonic properties [33]. NANOG and SOX2 also promote self-renewal and maintain of pluripotency of ESC. Although it has been demonstrated that each of these transcription factors has a specific role, NANOG, OCT4, and SOX2 cooperate to maintain stemness and pluripotency of embryonic cells [6,34]. In this study (Fig. 4), we did not

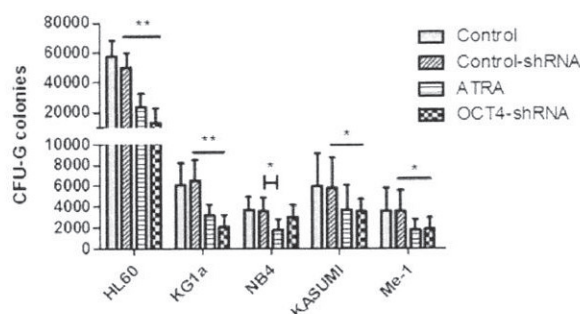


FIG. 5. Evaluation of clonogenic capacity in the presence of ATRA and shRNA treatment. CFU-G colonies were numbered in six separate experiments. Student's *t*-test was used to compare differences in the number of colonies. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

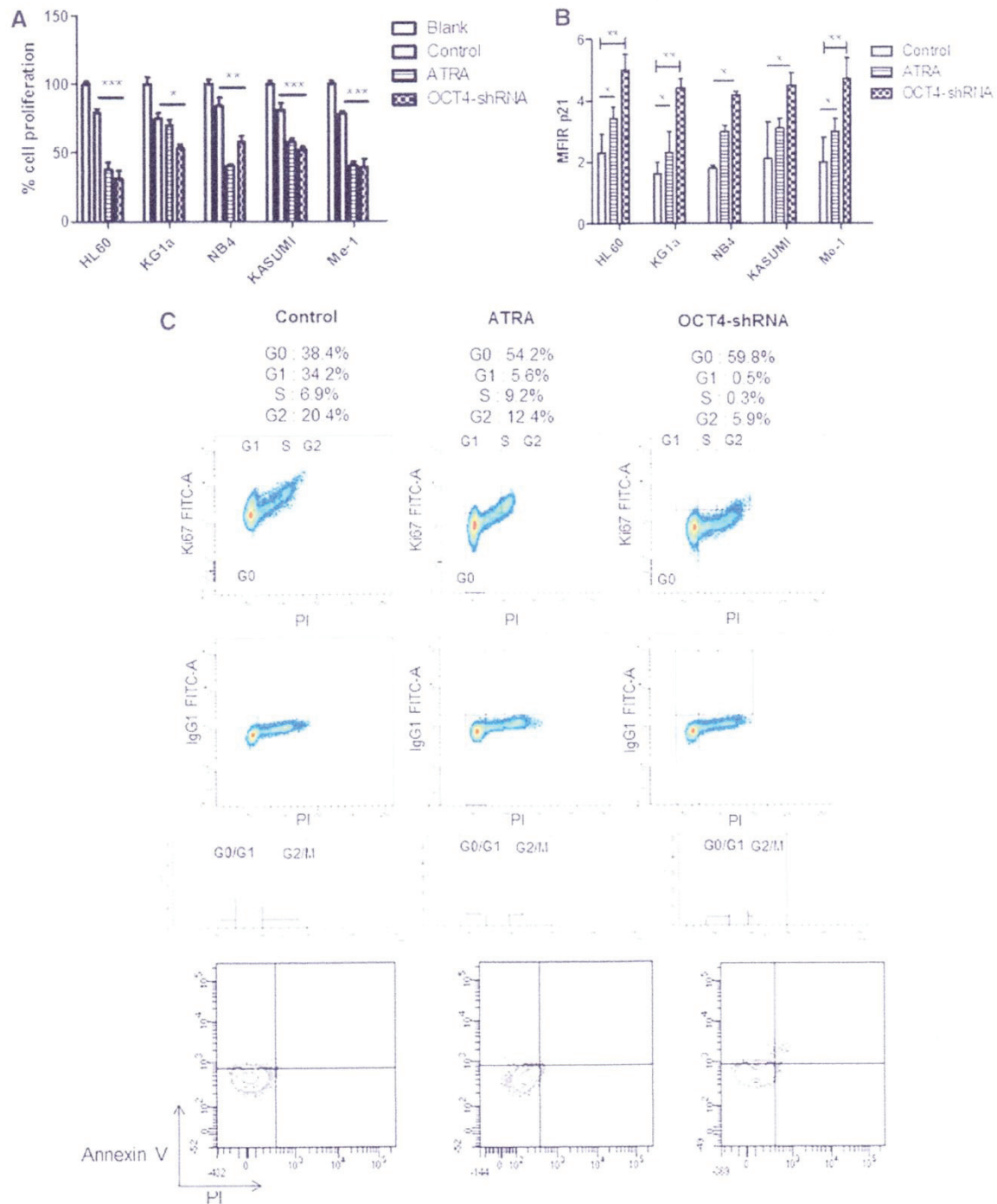


FIG. 6. Cell proliferation and cell cycle analysis after ATRA differentiation and ShRNA inhibition. **(A)** The cell proliferation percentage in each group was calculated by comparison to the untreated cells. **(B)** MFI ratio of p21 by MFC. **(C)** The cells were stained with PI and anti-Ki67 conjugated to FITC. An Annexin V/PI staining, to exclude apoptosis, and an isotype control staining with FITC mouse IgG1 was performed. The results are shown as the percentage of cells in different phases (representative experiment of HL60 leukemic line). All results are expressed as mean $\pm$ SD of six separate experiments. Student's *t*-test was used to compare differences in the percentage of cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. PI, propidium iodide.

observe significant variations of NANOG and SOX2 levels after differentiation or OCT4-shRNA treatment, which suggests that OCT4 is necessary to maintain the undifferentiated phenotype.

The causes for *POU5F1*/OCT4 deregulation in cancer cells remain unknown. One hypothesis would be an epigenetic dysregulation, as there is growing evidence of the implication of this phenomenon in acute leukemia and in preleukemic states. In AML cells, the differentiation arrest could be related to a downregulation of the miRNA let7c [35]. Let-7 processing is negatively regulated by lin28 [36,37], the expression of which is in turn under the control of stem cell transcription factors, including OCT4 [38]. This suggests a possible loop of activation maintaining high levels of OCT4 and points to a possible targeted therapy. Indeed, in a NTERA cell line model, Musch et al. reported that differentiation induced by purine analogs such as decitabine (but not by RA) resulted in a degradation of OCT4 by caspase 7 with a loss of clonogenic properties [39]. In our control experiments, we could confirm that RA induces a limited differentiation of NTERA-2 cells, but has no effect on OCT4 levels (data not shown).

In conclusion, our data strongly suggest the implication of OCT4 overexpression in leukemogenesis, at least in some leukemic subtypes. While the mechanism of this phenomenon remains to be elucidated, these findings point toward a potential use of OCT4 as a target for new antileukemic therapies.

Acknowledgments

We thank BD Biosciences for providing monoclonal antibodies. We thank Gisèle Froment, Didier Nègre, and Caroline Costa (SFR BioSciences de Lyon, UMS3444/US8) for their help with the lentivectors production, Elisabeth Dagueuet (Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth) for reviewing the article and Véronique Frachet (laboratoire AGIM de Grenoble) for her help in cell cycle analysis. Tiphane Picot was the recipient of a research grant from the association "Les Amis de Rémi."

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Chao MP, AJ Gentles, S Chatterjee, F Lan, A Reinisch, MR Corces, S Xavy, J Shen, D Haag, et al. (2017). Human AMPL-iPSCs reacquire leukemic properties after differentiation and model clonal variation of disease. *Cell Stem Cell* 20:329–344.
- Bonnet D and JE Dick. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3:730–737.
- Takahashi K, K Tanabe, M Ohnuki, M Narita, T Ichisaka, K Tomoda and S Yamanaka. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872.
- Niwa H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26:137–148.
- Pesce M and HR Schöler. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19: 271–278.
- Boyer LA, TI Lee, MF Cole, SE Johnstone, SS Levine, JP Zucker, MG Guenther, RM Kumar, HL Murray, et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122:947–956.
- Zhang X, J Zhang, T Wang, MA Esteban and D Pei. (2008). Esrrb activates Oct4 transcription and sustains self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 283: 35825–35833.
- Szabo E, S Rampalli, RM Risueño, A Schnerch, R Mitchell, A Fiebig-Comyn, M Levadoux-Martin and M Bhatia. (2010). Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 468:521–526.
- Prud'homme GJ. (2012). Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. *Curr Pharm Design* 18:2838–2849.
- Yasuda H, K Tanaka, Y Okita, T Araki, S Saigusa, Y Toiyama, T Yokoe, S Yoshiyama, A Kawamoto, C Miki and M Kusunoki. (2011). CD133, OCT4 and NANOG in ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Oncol Lett* 2: 1065–1071.
- Guzel E, OF Karatas, MB Duz, M Solak, M Ittmann and M Ozen. (2014). Differential expression of stem cell markers and ABCG2 in recurrent prostate cancer. *Prostate* 74:1498–1505.
- Lee SH, BS Koo, JM Kim, S Huang, YS Rho, WJ Bae, HJ Kang, YS Kim, JH Moon and YC Lim. (2014). Wnt/ β -catenin signalling maintains self-renewal and tumorigenicity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cells by activating Oct4. *J Pathol* 234:99–107.
- Yin JY, Q Tang, LL Zhai, LY Zhou, J Qian, J Lin, XM Wen, JD Zhou, YY Zhang, XW Zhu and ZQ Deng. (2015). High expression of OCT4 is frequent and may cause undesirable treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Tumor Biol* 36:9711–9716.
- Picot T, C Aanei, A Fayard, P Flandrin-Gresta, S Tondeur, M Gouttenoire, E Tavernier-Tardy, E Wattel, D Guyotat, and L Campos-Catafal. (2017). Expression of embryonic stem cells markers in acute myeloid leukemia. *Tumor Biol* 39:1010428317716629.
- Wang X and J Dai. (2010). Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells* 28:885–893.
- Rijlaarsdam MA, HADM van Herk, AJ Gillis, H Stoop, G Jenster, J Martens, GJ van Leenders, W Dinjens, AM Hoogland, M Timmermans and LH Looijenga. (2011). Specific detection of OCT3/4 isoform A/B/B1 expression in solid (germ cell) tumours and cell lines: confirmation of OCT3/4 specificity for germ cell tumours. *Brit J Cancer* 105:854–863.
- Lemma S, S Avnet, M Salerno, T Chano and N Baldini. (2016). Identification and validation of housekeeping genes for gene expression analysis of cancer stem cells. *PLoS One* 11:e0149481.
- Riss TL, RA Moravec, AL Niles, S Duellman, HA Benink, TJ Worzella and L Minor. (2004). Cell viability assays. In: *Assay Guidance Manual*. Sittampalam S, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, Austin C, Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Zhu J and SG Emerson. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21:3295–3313.
- Tohda S, JE Curtis, EA McCulloch and MD Minden. (1992). Comparison of the effects of all-trans retinoic acid and cis-retinoic acid on the blast stem cells of acute myeloblastic leukemia in culture. *Leukemia* 6:656–661.

21. Abbas T, and A Dutta. (2009). P21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9:400–414.
22. Liu M, MH Lee, M Cohen, M Bommakanti, and LP Freedman. (1996). Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* 10:142–153.
23. Du Z, D Jia, S Liu, F Wang, G Li, Y Zhang, X Cao, EA Ling and A Hao. (2009). OCT4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia* 57:724–733.
24. Hochedlinger K, Y Yamada, C Beard and R Jaenisch. (2005). Ectopic expression of OCT4 blocks progenitor cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 121:465–477.
25. Ikushima H, T Todo, Y Ino, M Takahashi, N Saito, K Miyazawa and K Miyazono. (2011). Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *J Biol Chem* 286:41434–41441.
26. Nichols J, B Zevnik, K Anastasiadis, H Niwa, D Klewe-Nebenius, I Chambers, H Schöler and A Smith. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379–391.
27. Niwa H, J Miyazaki and AG Smith. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372–376.
28. Milella M, SM Kornblau, Z Estrov, BZ Carter, H Lapillonne, D Harris, M Konopleva, S Zhao, E Estey and M Andreeff. (2001). Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 108:851–859.
29. Ricciardi MR, T McQueen, D Chism, M Milella, E Estey, E Kaldjian, J Sebolt-Leopold, M Konopleva and M Andreeff. (2005). Quantitative single cell determination of ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19:1543–1549.
30. Steensma DP, RF McClure, JE Karp, A Tefferi, TL Lasho, HL Powell, GW DeWald and SH Kaufmann. (2006). JAK2V617F is a rare finding in denovo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia* 20:971–978.
31. Scholl C, D Bansal, K Döhner, K Eiwen, BJ Huntly, BH Lee, FG Rücker, RF Schlenk, L Bullinger, et al. (2007). The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis. *J Clin Invest* 117:1037–1048.
32. Rawat VPS, S Thoene, VM Naidu, N Arseni, B Heilmeier, K Metzeler, K Petropoulos, A Deshpande, L Quintanilla-Martinez, et al. (2008). Overexpression of CDX2 perturbs HOX gene expression in murine progenitors depending on its N-terminal domain and is closely correlated with de-regulated HOX gene expression in human acute myeloid leukemia. *Blood* 111:309–319.
33. Takahashi K and S Yamanaka. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.
34. Loh YH, Q Wu, JL Chew, VB Vega, W Zhang, X Chen, G Bourgue, J George, B Leong, et al. (2006). The OCT4 and NANOG transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38:431–440.
35. Pelosi A, S Careccia, V Lulli, P Romania, G Marziani, U Testa, S Lavorgna, F Lo-Coco, MC Petti, et al. (2013). miRNA let-7c promotes granulocytic differentiation in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 32:3648–3654.
36. Heo I, C Joo, J Cho, M Ha, J Han and VN Kim. (2008). Lin 28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell* 32:276–284.
37. Visvanathan J, S Lee, B Lee, JW Lee and SK Lee. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* 21:744–749.
38. Tiscornia G and JC Izpisua Belmonte. (2010). MicroRNA is embryonic stem cell function and fate. *Genes Dev* 24: 2732–2741.
39. Musch T, Y Öz, F Lyko and A Breiling. (2010). Nucleoside drugs induce cellular differentiation by caspase-dependent degradation of stem cell factors. *PLoS One* 5:e10726.

Address correspondence to:
Prof. Lydia Campos
Laboratoire d'Hématologie
CHU de Saint-Etienne
Saint-Etienne 42055
France

E-mail: lydia.campos@chu-st-etienne.fr

Received for publication June 29, 2017
 Accepted after revision September 11, 2017
 Prepublished on Liebert Instant Online October

Résultats préliminaires

Evaluation de l'expression des antigènes embryonnaires à travers les voies de signalisation NOTCH et AKT

Ces résultats se décomposent en deux études. La première étude vise à étudier l'expression des antigènes embryonnaires à travers la voie de signalisation NOTCH. La seconde étude concerne l'implication de l'inhibition de la voie AKT sur les antigènes embryonnaires et sur les propriétés des cellules leucémiques.

Etude 1 : Voie de signalisation NOTCH

1. Introduction

Au cours des dernières années, des dérégulations de voies de signalisation ont été décrites dans la plupart des cancers, participant, à leur initiation, leur développement ou leur maintenance. Le développement de thérapies ciblées dans ce domaine repose sur la connaissance des mécanismes d'activation normale des voies de signalisation et sur l'identification des mécanismes oncogéniques dérégulés au sein de ces voies dans le cancer, pouvant conduire à leur activation constitutive. Cependant à ce jour peu de thérapie ciblant les voies de signalisation des cellules cancéreuses ont fait preuve d'efficacité, il est donc important de mieux les comprendre afin d'améliorer la prise en charge des patients (Willems and Bouscary 2011).

Nous nous sommes intéressés à l'étude de la différenciation leucémique et c'est pourquoi nous avons choisi d'étudier la voie de signalisation NOTCH. C'est une voie de signalisation dont le rôle oncogénique a été identifié notamment dans la leucémie aigüe lymphoïde (Weng and Aster 2004) mais il reste à être défini dans la leucémie aigüe myéloïde.

On retrouve quatre types de récepteurs NOTCH chez les mammifères numérotés de 1 à 4. Ils interagissent avec cinq ligands, Delta like DLL1, DLL3, DLL4, JAGGED1 et JAGGED 2. La fixation du ligand sur son récepteur NOTCH entraîne une protéolyse intracellulaire avec le clivage de la partie intra cellulaire de NOTCH par une gamma sécrétase et sa translocation dans le noyau. ICN est complexé avec le facteur de transcription CSL ce qui induit la transcription des gènes cibles tels que les gènes des familles HES et MYC. (Habets et al. 2015; Tohda 2014; Sliwa et al. 2014).

NOTCH1 est associé au processus précoce de la différenciation (Yu et al. 2016). NOTCH2 régule l'expression de gènes du développement embryonnaire et de gènes impliqués dans le fonctionnement des systèmes hématopoïétiques, immunitaires, cardiovasculaires, hépatiques et rénaux. Une expression anormale de NOTCH2 pourrait intervenir dans le développement de carcinome hépatocellulaire (W.-R. Wu et al. 2016). NOTCH3 joue un rôle clé dans le développement neural et une expression aberrante serait associée à un syndrome de méningocèle (Gripp et al. 2015). NOTCH4 est très exprimé par les cellules cardiaques, les cellules endothéliales et par certaines cellules CD34⁺ et CD34⁻ de la moelle osseuse. Il est surexprimé par les cellules de certains cancers, tels que le sein, le colon, le poumon ou la bouche (MK et al. 2016). Une activation de la voie de signalisation de NOTCH entraîne une inhibition de la différenciation cellulaire (Kageyama and Ohtsuka 1999). NOTCH joue un rôle important dans la régulation et l'entretien des cellules souches normales, et donc potentiellement aussi pour les cellules souches leucémiques (Tohda 2014).

L'implication potentielle de la voie de signalisation NOTCH dans les pathologies malignes a été mise en évidence en premier grâce à la translocation t(7;9) dans les leucémies aiguës lymphoïdes touchant la lignée T (LAL-T) (Weng and Aster 2004). 50% des patients avec une LAL-T, présente une mutation de NOTCH1 cependant cette mutation est très rare chez les patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes (Tohda 2014).

Les informations quant au rôle de la voie de signalisation de NOTCH dans la leucémie aiguë myéloïde sont limitées et controversées. L'équipe de Kode et al. a montré que la stimulation de l'expression de JAGGED1 qui est un ligand du récepteur NOTCH induisait l'apparition de LAM, ce qui met en évidence le rôle oncogénique de NOTCH (Kode et al. 2014). Cependant une autre étude a montré que l'inhibition de NOTCH n'avait aucune influence sur la croissance des cellules de LAM (Tohda 2014).

L'objectif de cette étude est d'analyser comment les antigènes embryonnaires sont contrôlés par la voie de signalisation NOTCH. Pour cela, nous avons étudié, par cytométrie en flux, l'expression membranaire des quatre protéines de la voie NOTCH (NOTCH 1, 2, 3, 4) (BD Biosciences, concentration finale 5µg/100µL) et de leur ligand (JAGGED 1, JAGGED 2, Delta like 1, Delta like 2, Delta like 3, Delta like 4) (BD Biosciences, concentration finale : 5µg/100µL) dans les lignées cellulaires leucémiques, dans 4 moelles osseuses normales et 30

moelles osseuses de patients atteints de LAM. Nous avons également regardé l'implication de cette voie de signalisation dans la différenciation par l'acide *cis-trans* rétinolique, sur les lignées cellulaires (NB4, ME-1, KASUMI, KG1a, NTERA-2), à l'aide d'un inhibiteur de la gamma-sécrétase (Semagacestat SC3646I4A) ajouté lors de la culture cellulaire (Santa Cruz Biotechnology, concentration finale de 1mM dans 8mL de milieu de culture pendant 48h à 37°C, 5% CO₂).

2. Résultats

Les résultats obtenus ont montré que NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4 étaient exprimées dans les cellules leucémiques et de façon plus importante dans le compartiment immature des cellules leucémiques CD34⁺CD38⁻. Par contre, NOTCH3 serait plus exprimé au niveau des blastes et beaucoup moins au niveau des cellules CD34⁺CD38⁻. Concernant les ligands, nous avons observé une très forte expression des ligands JAGGED 1, JAGGED 2 et DLL4 dans les cellules CD34⁺CD38⁻ et une expression moins forte des ligands DLL1, DLL2 et DLL3 (*Figure 20*).

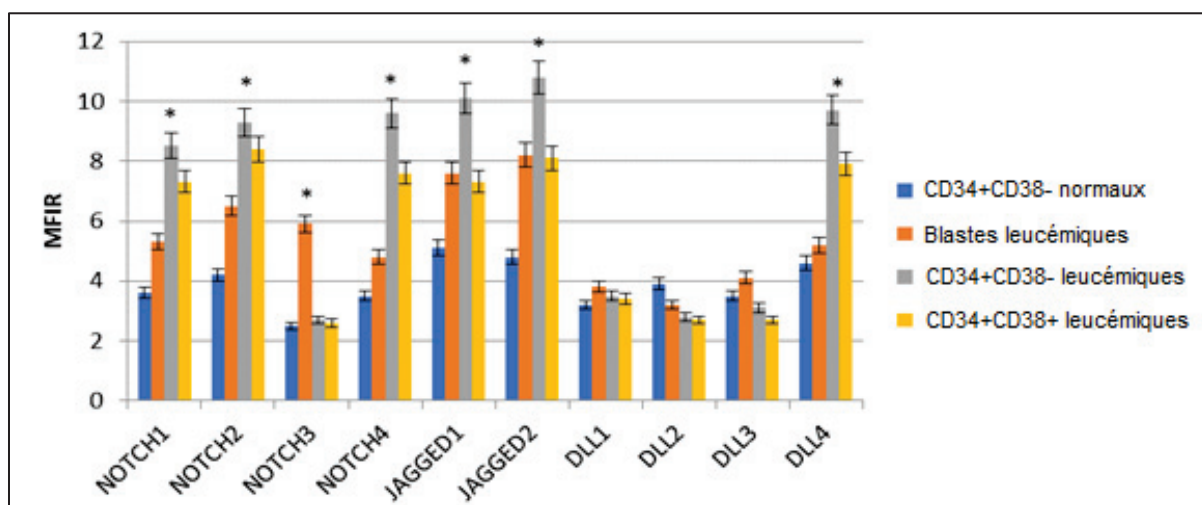


Figure 20 : Expression des quatre protéines NOTCH et des ligands associés dans différents compartiments leucémiques

Après différenciation cellulaire avec l'acide *cis-trans* rétinolique (*Figure 21*), nous avons pu observer une diminution des protéines NOTCH et de ses ligands dans les lignées cellulaires leucémiques et cette diminution était encore plus significative pour un sous-type de LAM qui est la LAM avec les anomalies RUNX1-RUNX1T1 et t(8;21) faisant de cette voie un mécanisme important dans la dédifférenciation des LAM.

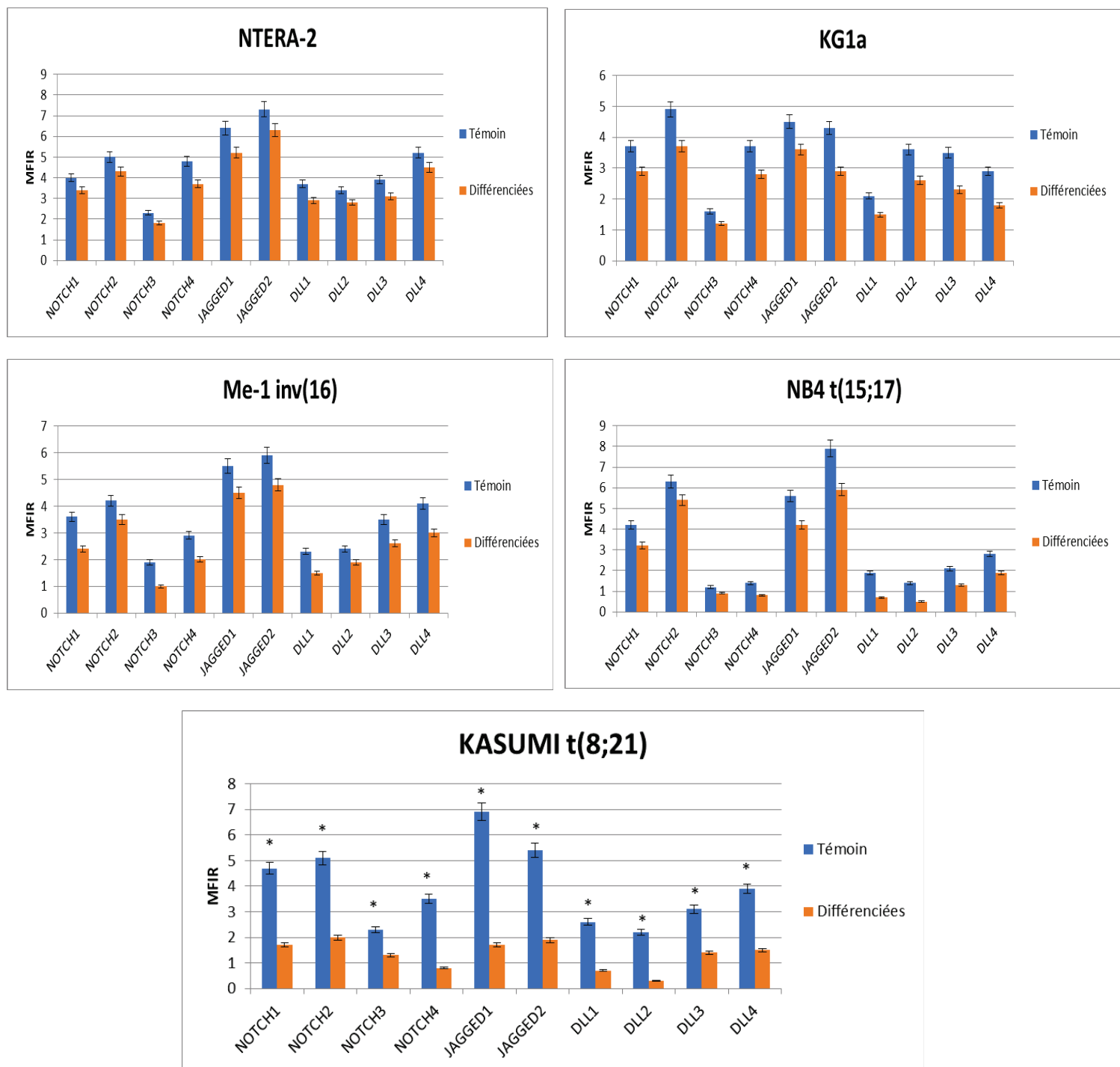


Figure 21 : Expression des quatre protéines NOTCH et des ligands associés avant et après différenciation

Nous avons également voulu vérifier si cette voie était bien impliquée dans la différenciation en inhibant cette voie par un inhibiteur de la gamma-sécrétase (*Figure 22*). Après inhibition, nous avons évalué l'expression des marqueurs embryonnaires. Les résultats ont montré qu'une inhibition de la voie NOCTH induisait une différenciation cellulaire morphologique et phénotypique (augmentation de CD11b) dans l'ensemble des lignées cellulaires. Cette différenciation est associée à une diminution des marqueurs OCT4,

NANOG, SSEA3 et une augmentation de SSEA1 dans les lignées cellulaires leucémiques. Nous avons observé une diminution significative de SOX2 et une augmentation significative de SSEA1 dans les LAM avec les anomalies RUNX1-RUNX1T1 et t(8 ;21).

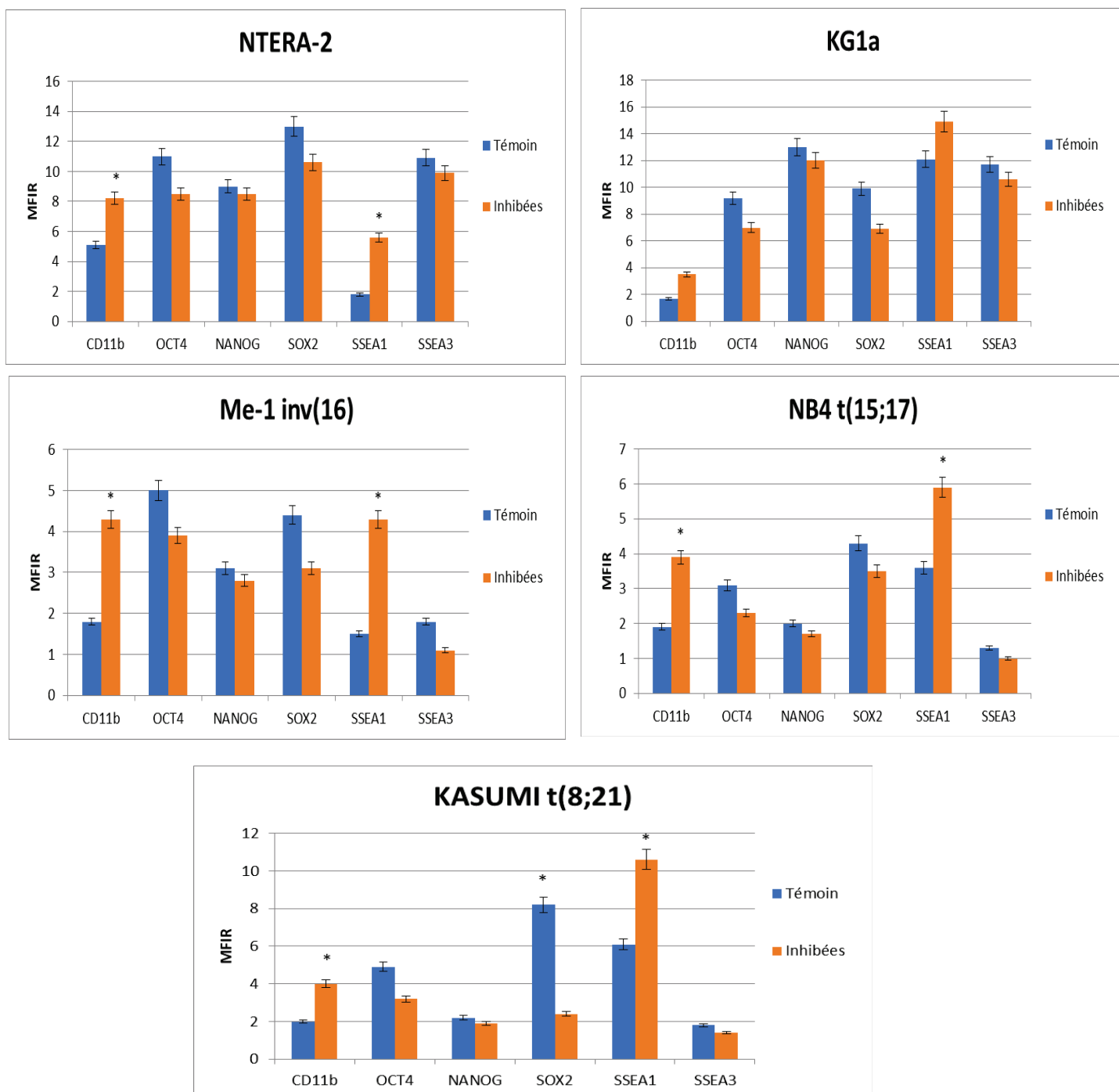


Figure 22 : Expression de CD11b et des marqueurs embryonnaires avant et après inhibition

3. Conclusion

Cette première étude préliminaire nous laisse penser que la voie de signalisation NOTCH aurait un rôle dans la leucémie aiguë myéloïde et plus particulièrement dans la dédifférenciation puisqu'une inhibition de cette voie entraîne une différenciation cellulaire dans les cellules leucémiques et plus spécialement dans la LAM avec les anomalies RUNX1-RUNX1T1 et t(8 ;21). Il serait intéressant de poursuivre cette étude en étudiant son inhibition dans les cellules leucémiques de patients et en regardant si nous avons une régulation des marqueurs OCT4 et SOX2 par cette voie de signalisation lors d'une LAM et plus spécifiquement lors d'une LAM avec les anomalies RUNX1-RUNX1T1, t(8 ;21). De plus, une stimulation de cette voie serait intéressante afin de confirmer son rôle dans la différenciation cellulaire lors de la Leucémogénèse.

Etude 2 : Voie de signalisation Akt

1. Introduction

La voie PI3K/AKT est très fréquemment activée dans les LAM et est nécessaire pour la prolifération et la survie des blastes. La phosphorylation d'AKT peut être détectée dans 50% à 80% des cellules de patients atteints de LAM (Martelli et al. 2010). L'activation constitutive de PI3K/AKT est observée dans 50% des prélèvements de LAM de novo après privation de sérum et de cytokines (Tamburini et al. 2007).

Sa dérégulation est un événement favorisant dans l'apparition des cancers (Schmelzle and Hall 2000). Les gènes de cette voie sont oncogènes ou anti-oncogènes, c'est pourquoi leur mutation peut favoriser le développement tumoral. Récemment, AKT a été montré comme jouant un rôle dans l'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires de souris. Ces cellules contribuent également au développement de l'embryon après transfert dans des blastocystes, elles sont donc pluripotentes. La voie PI3K/AKT participe à l'équilibre entre mort et survie cellulaire. Or les cellules cancéreuses sont caractérisées par une rupture de cet équilibre.

Ainsi, le but de notre étude est d'étudier la conséquence d'une inhibition de cette voie de signalisation sur l'expression des antigènes embryonnaires exprimés par les cellules leucémiques.

Pour cela, nous avons regardé l'expression d'AKT (BD Biosciences, concentration finale : 10µg/100µL) dans 30 moelles de patients atteints de LAM et 4 moelles de donneur

par cytométrie en flux. La voie de signalisation AKT étant intracellulaire, le marquage par cytométrie en flux a été réalisé en utilisant le protocole de fixation/perméabilisation utilisé pour l'étude des antigènes embryonnaires. Ensuite, nous avons inhibé AKT dans les lignées leucémiques (NB4, ME-1, KASUMI, KG1a, NTERA-2) par ajout de l'inhibiteur « AKT inhibitor » dans les cultures cellulaires (Santa Cruz Biotechnology, concentration finale : 5 μ M pendant 48h à 37°C, 5%CO₂). Cette inhibition nous a permis d'évaluer l'expression des antigènes embryonnaires après inhibition ainsi que les conséquences de cette inhibition sur la prolifération cellulaire et la capacité clonogénique.

2. Résultats

Nous avons montré par cytométrie en flux, une forte expression d'AKT dans les 30 moelles leucémiques en comparaison aux 4 moelles normales (*Figure 23*). L'expression est plus importante dans les cellules CD34⁺CD38⁻ avec un MFIR de 2.9 pour les cellules normales et un MFIR de 4.5 pour les cellules leucémiques.

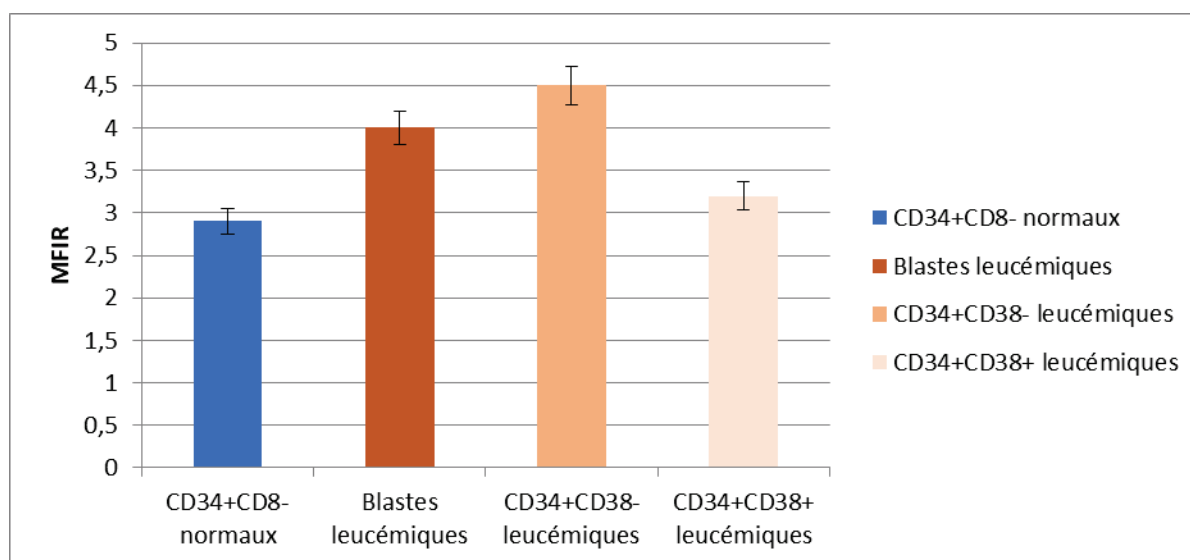


Figure 23 : Expression d'Akt dans différents compartiments leucémiques

Ensuite, nous avons inhibé AKT avec l'inhibiteur « AKT inhibitor » de chez Sigma Aldrich (*Figure 24*). Les résultats de l'ensemble des lignées cellulaires ont montré une baisse de l'expression de tous les antigènes embryonnaires après inhibition d'AKT avec une diminution d'OCT4, SOX2, SSEA3 et SSEA1 et plus significativement de NANOG ($p < 0.05$) excepté pour la lignée ME-1. La diminution de NANOG est encore plus significative dans les LAM avec les anomalies PML-RAR α et t(15 ;17) ($p < 0.01$).

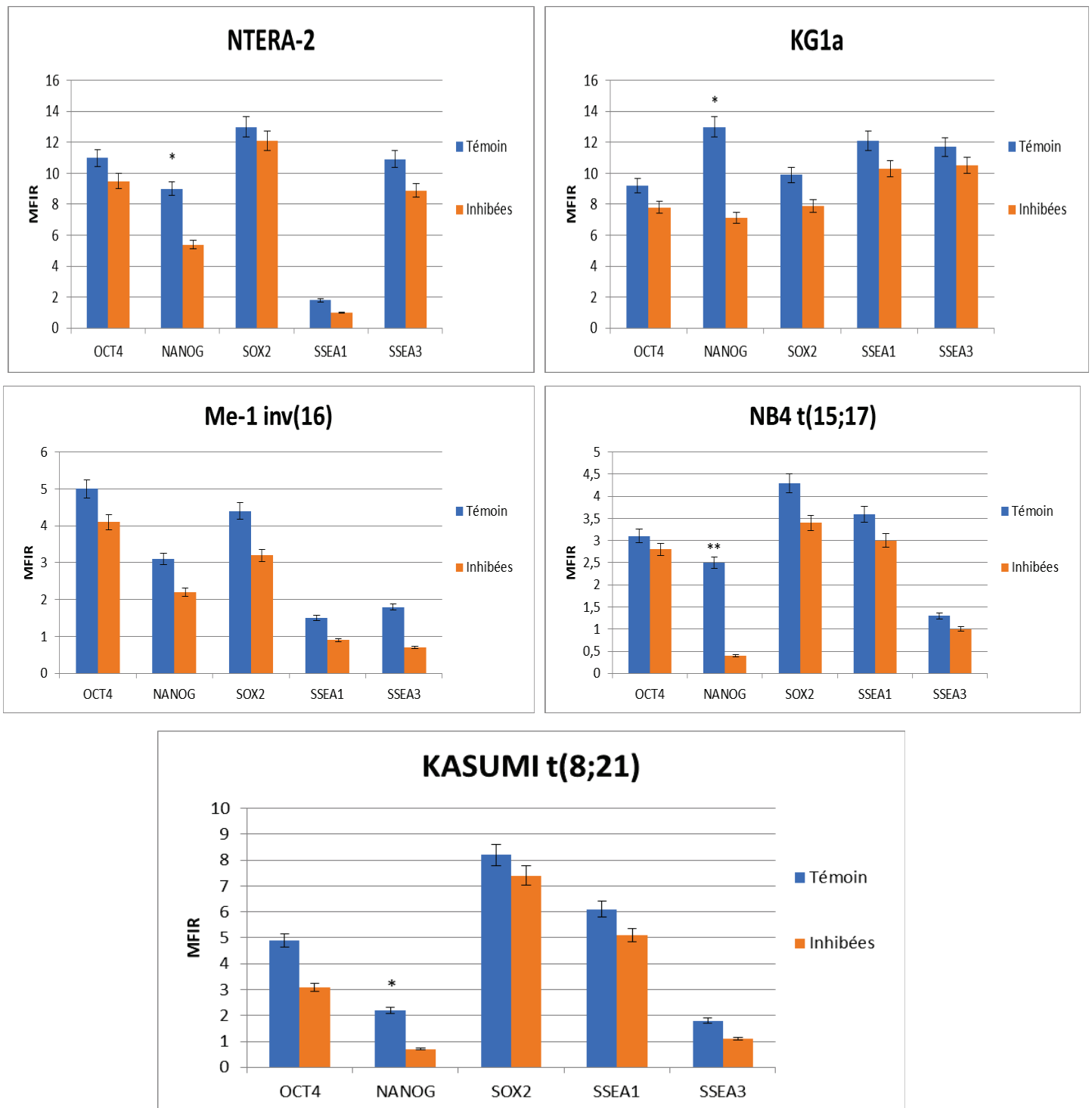


Figure 24 : Expression des marqueurs embryonnaires avant et après inhibition d'Akt

Les conséquences de l'inhibition d'AKT sur la capacité clonogénique et le nombre de CFU-G ont été étudiées par culture clonogénique (*Figure 25*). Après inhibition, une baisse importante du nombre de colonies leucémiques peut être observé excepté pour la lignée ME-1

(8700 vs 4100 pour la lignée NTERA-2 ($p<0.05$), 7300 vs 3800 pour la lignée KG1a ($p<0.05$), 6900 vs 1500 pour la lignée NB4 ($p<0.001$), 2100 vs 1900 pour la lignée ME-1 et 8600 vs 3900 pour KASUMI ($p<0.05$).

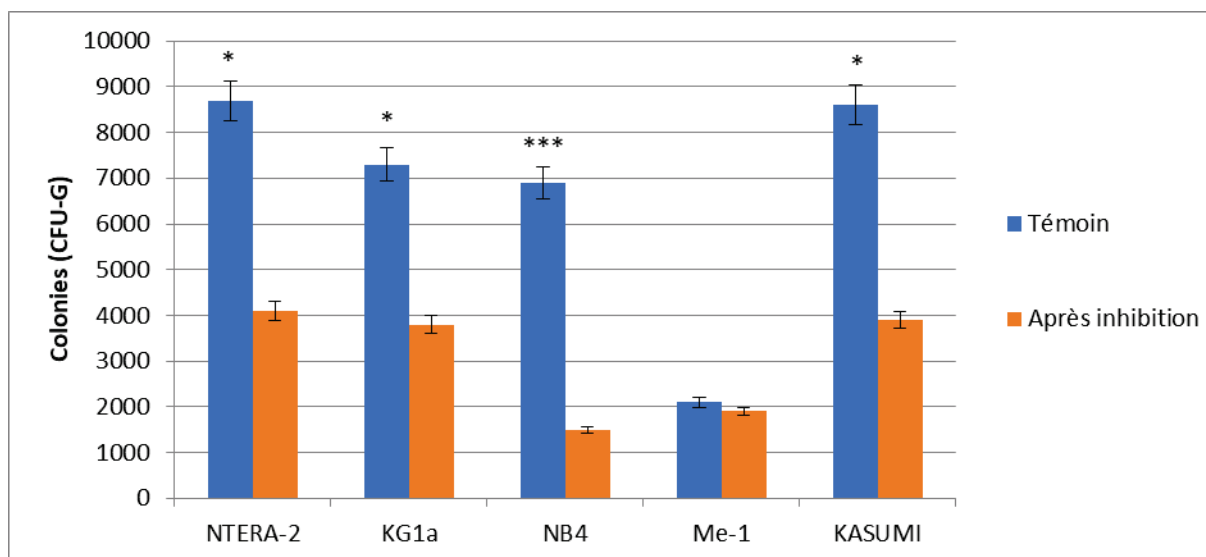


Figure 25 : Nombre de colonies avant et après inhibition d'AKT

AKT est présent dans les LAM et jouerait un rôle dans la prolifération. Nous avons donc voulu voir si AKT pouvait jouer un rôle dans la prolifération cellulaire chez un sous-type de LAM en utilisant la technique WST (*Figure 26*). Les résultats montrent une diminution du pourcentage de prolifération cellulaire dans toutes les lignées cellulaires leucémiques après inhibition et ce pourcentage est encore plus important dans la LAM avec les anomalies PML-RAR α et t(15 ;17).

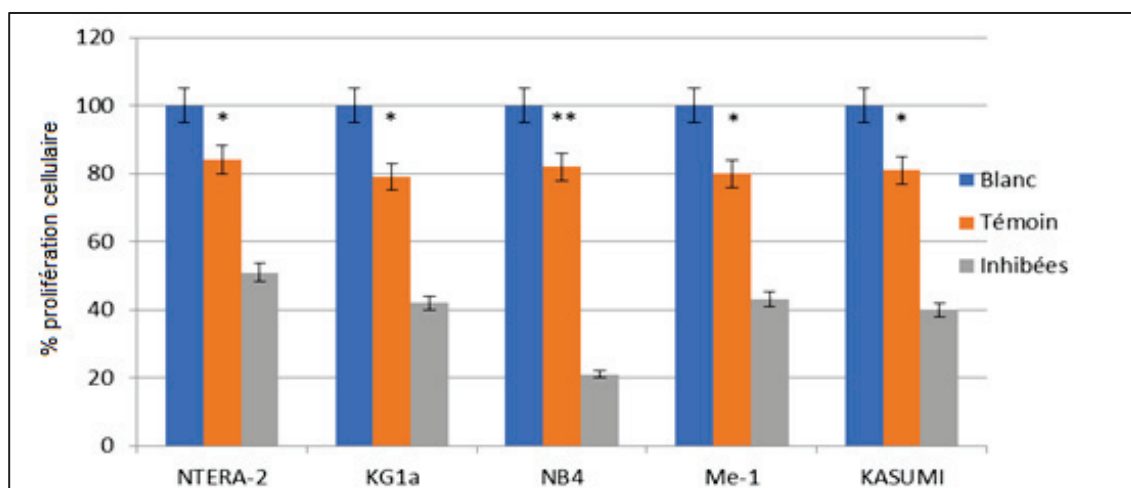


Figure 26 : Pourcentage de prolifération cellulaire avant et après inhibition d'AKT

3. Conclusion

Cette seconde étude préliminaire nous laisse penser que la voie de signalisation AKT aurait un rôle dans la leucémie aiguë myéloïde et plus particulièrement dans la prolifération et la capacité clonogénique puisqu'une inhibition de cette voie entraîne un arrêt de la prolifération cellulaire et une diminution de la capacité clonogénique dans les cellules leucémiques et plus spécialement dans la LAM avec les anomalies PML-RAR α et t(15 ;17). Il serait intéressant de poursuivre cette étude en étudiant son inhibition dans les cellules leucémiques de patients et en regardant si nous avons une régulation du marqueur NANOG par cette voie de signalisation lors d'une LAM et plus spécifiquement lors d'une LAM avec les anomalies PML-RAR α et t(15 ;17). De plus, une étude sur la protéine PI3K associée à AKT et une stimulation de cette voie serait intéressante afin de confirmer son rôle dans la prolifération cellulaire lors de la Leucémogenèse.

DISCUSSION / PERSPECTIVES

Discussion

Dans ce travail, nous avons entrepris d'évaluer l'expression des antigènes embryonnaires dans une hémopathie maligne, la leucémie aiguë myéloïde. Nous avons ainsi pu montrer la présence aberrante des antigènes embryonnaires dans le compartiment immature des cellules souches leucémiques $CD34^+CD38^-$ et que ces antigènes embryonnaires, en particulier OCT4, pourraient jouer un rôle fonctionnel dans la leucémie aiguë myéloïde par blocage de la différenciation et augmentation de la prolifération et de la capacité clonogénique.

Dans une première partie de l'étude, nous avons pu démontrer que les antigènes embryonnaires généralement présents dans les cellules souches embryonnaires et les tumeurs des cellules germinales, sont détectés à la surface ou dans les cellules leucémiques. La réexpression des antigènes embryonnaires a été précédemment montrée dans les tumeurs solides (Amaya and Bryan 2015; Wang et al. 2009; Y Liu et al. 2014). En ce qui concerne les hémopathies malignes, peu de données sont disponibles et principalement dans des séries limitées de patients. L'expression d'OCT4, NANOG et SOX2 a été étudiée par qRT-PCR et immunofluorescence dans les lignées de cellules leucémiques et ces facteurs de transcription peuvent être impliqués dans la pathogénèse des leucémies possédant l'anomalie MLL/AF9. Plus récemment, Yin et al ont décrit une forte expression d'OCT4 par qRT-PCR dans une large série de 87 patients (Yin et al. 2015). Nous avons observé l'expression de ces marqueurs dans l'ensemble des lignées cellulaires hématopoïétiques, et dans les cellules leucémiques de plusieurs patients quel que soit le type de LAM par rapport aux cellules hématopoïétiques normales. Cependant l'expression d'OCT4 était plus haut dans les leucémies moins différenciées alors que les niveaux de SSEA1 étaient plus hauts sur les sous-types plus différenciés, ce qui est conforme à l'expression régulière de ce récepteur le long de la différenciation myéloïde et des granulocytes. Jusqu'à présent, les seules cellules connues pour exprimer des niveaux d'expression élevés des antigènes embryonnaires dans la moelle normale sont rares et controversées et correspondent à un sous-groupe cellulaire appelé « Very Small Embryonic-Like stem cells » (VSEL). Les VSEL semblent être des cellules primitives immatures résidant dans des tissus de souris adultes et fœtales et ont également été décrits dans le sang de cordon chez l'homme (Kucia, Halasa, et al. 2006 ; Kucia, Reca, et al. 2006). Dans cette étude, nous avons pu déterminer la forte expression des marqueurs embryonnaires OCT4, NANOG, SOX2 et SSEA3 dans le compartiment des cellules leucémiques immatures $CD34^+CD38^-CD90^-$. Cette expression était plus faible au niveau du

compartiment des cellules leucémiques matures CD34⁺CD38⁺CD90⁻. A l'inverse, nous avons pu observer une faible expression de SSEA1 dans tous les compartiments leucémiques. Concernant l'évaluation de leur expression dans le suivi de la LAM, nous avons pu noter une augmentation d'expression de SSEA1 et une diminution d'expression de NANOG, OCT4, SOX2 et SSEA3 lors de la rémission complète. A l'inverse, lors d'une rechute de la maladie, nous pouvons observer une diminution de l'expression de SSEA1 et une augmentation de l'expression de NANOG, OCT4, SOX2 et SSEA3. Il semble donc que ces marqueurs embryonnaires constituent des marqueurs intéressants pour le suivi de la maladie résiduelle.

Une autre partie du travail a été de déterminer l'impact pronostique des marqueurs embryonnaires au cours des LAM. Nous n'avons pas mis en évidence de différence d'expression en fonction des caractéristiques cytogénétiques initiales qui représentent pourtant un facteur pronostique essentiel à la prise en charge thérapeutique des patients. Malgré le fait que les LAM représentent un groupe très hétérogène d'hémopathies malignes nous n'avons pas mis en évidence, en fonction de l'expression des marqueurs embryonnaires, de catégories qui seraient caractéristiques de mécanismes oncogénétiques particuliers. Cependant, nous avons démontré qu'une plus forte expression des marqueurs SOX2, SSEA3 et NANOG au diagnostic est associée à une meilleure survie globale et sans progression alors qu'à l'inverse, c'est une plus faible expression de SSEA1 qui apparaît de meilleur pronostic. Ces résultats sont donc inattendus car on pouvait penser que les survies globales et sans progression seraient meilleures en cas de faible expression des marqueurs OCT4, SSEA3, NANOG et SOX2 qui ne sont pas ou faiblement exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques normales et fortement exprimés par les cellules souches leucémiques. Cependant l'impact pronostique des marqueurs n'est pas toujours très bien défini en cancérogenèse puisque certaines études ont démontré que dans certains cancers, les cellules cancéreuses exprimaient plus faiblement les marqueurs embryonnaires SOX2 et OCT4 par rapport aux cellules non cancéreuses et qu'une expression plus faible est de pronostic défavorable (Werbowski-Ogilvie et al. 2009).

Ces données suggèrent que les marqueurs embryonnaires OCT4, NANOG, SOX2 et SSEA3 pourraient être des marqueurs de cellules souches leucémiques. Ces données préliminaires montrent que l'expression de beaucoup de marqueurs embryonnaires est significativement différente au diagnostic et en rémission. De plus, l'ajout de nouveaux marqueurs pour étudier la maladie résiduelle pourrait aider à identifier les cellules souches leucémiques résiduelles lors de la rémission.

Dans une seconde partie de l'étude, nous nous sommes intéressés au rôle fonctionnel des marqueurs embryonnaires dans la leucémie aiguë myéloïde. Bien que l'inhibition du facteur NANOG ait été réalisée, nous avons choisi de mettre en avant les résultats d'inhibition pour OCT4 qui est le seul marqueur dont le taux d'inhibition correspondait à 85% de cellules inhibées après plusieurs mises au point. Le taux d'inhibition de NANOG que l'on a réussi à atteindre était de 55% et bien que nous ayons une tendance à avoir une diminution de la capacité clonogénique et une induction de la différenciation cellulaire pour une lignée leucémique (KG1a), nous ne pouvons pas conclure sur son rôle car les résultats n'étaient pas significatifs. Nous devons poursuivre la mise au point afin d'obtenir un meilleur taux d'inhibition.

Cette étude sur le rôle fonctionnel, nous a permis de montrer que la sous-régulation du facteur de transcription OCT4 réduisait la prolifération cellulaire et induisait la différenciation cellulaire. De plus, cette inhibition réduisait le nombre de colonies cellulaires dans les cultures clonogéniques. Ces résultats suggèrent le rôle fonctionnel d'OCT4 dans la Leucémogénèse. L'effet d'OCT4 sur la différenciation cellulaire tumorale a été reporté dans plusieurs types de cancers (Du et al. 2009; Hochedlinger et al. 2005). Cependant, le rôle d'OCT4 dans le développement et la progression de tumeurs malignes n'a pas été totalement déterminé. La surexpression d'OCT4 pourrait induire la dérégulation d'autres protéines à travers différentes voies de signalisation (MAPK, JAK/STAT3).

Des études préliminaires ont été menées pour évaluer le rôle de deux voies de signalisation (NOTCH et AKT) dans la régulation des antigènes embryonnaires. L'étude sur la voie de signalisation NOTCH montre qu'il semble intéressant de poursuivre ce travail car la sous-régulation de cette voie pourrait être associée à une induction de la différenciation cellulaire par un contrôle de l'expression de SOX2. Concernant la voie de signalisation AKT, le fait d'inhiber cette voie permettrait d'empêcher le maintien de la prolifération des cellules souches leucémiques en contrôlant l'expression de NANOG. Ces activations aberrantes pourraient contribuer aux différentes propriétés caractérisant la LAM, mais les mécanismes d'activation de ces voies restent à étudier.

Perspectives

De nombreuses perspectives s'offrent à nous pour poursuivre cette étude sur l'évaluation des antigènes embryonnaires dans les cellules souches leucémiques. Tout d'abord, nous avons pu discuter que ces antigènes embryonnaires pourraient être utilisés comme marqueurs discriminant dans la maladie résiduelle des LAM afin de distinguer les cellules souches leucémiques résiduelles des cellules souches hématopoïétiques normales. Pour ce faire, il serait intéressant de coupler ces antigènes embryonnaires avec d'autres marqueurs comme par exemple CD45RA qui a été montré comme étant un marqueur relevant des cellules souches leucémiques (Kersten et al. 2016). Il serait également intéressant de relier la forte expression de ces marqueurs à des mutations particulières par la technique de séquençage à haut débit (NGS).

Plus fondamentalement, nous souhaitons étudier si la surexpression des antigènes embryonnaires est associée à des caractéristiques fonctionnelles de cellules souches (auto-renouvellement et maintien à long terme). La définition de la cellule souche leucémique reste sujette à débats. L'équipe de Goardon a montré que deux populations possédant un phénotype de progéniteur hématopoïétique coexistaient chez beaucoup de patients. Ces populations ont une activité de cellules souches leucémiques mais ressemblent de façon moléculaire aux progéniteurs normaux. De plus, les cellules leucémiques $CD34^+CD38^-$ sont moléculairement et phénotypiquement similaires aux progéniteurs LMPP correspondant au compartiment immature, et les cellules leucémiques $CD34^+CD38^+$ sont associées aux progéniteurs GMP correspondant au compartiment mature (Goardon et al. 2011). Il serait donc intéressant de regarder l'expression des antigènes embryonnaires sur ces progéniteurs LMPP et GMP. Enfin, le meilleur test permettant de démontrer le caractère de cellules souches reste la transplantabilité. Le tri de cellules en fonction de l'expression des antigènes embryonnaires, ou l'inhibition de ces facteurs, avant greffe à la souris immunodéprimée permettraient de démontrer formellement leur rôle dans la Leucémogénèse. En sens inverse, nous souhaitons forcer par transfection l'expression de ces facteurs, notamment OCT4, dans des cellules CD34 normales issues de moelles ou de sang placentaire, pour déterminer leur rôle dans le maintien d'un état fonctionnel de cellules souches.

Une étude préliminaire sur l'expression de ces antigènes embryonnaires dans d'autres hémopathies malignes et notamment dans les syndromes myélodysplasiques (qui est un état pré-leucémique) est en cours au laboratoire afin de voir si l'on peut discriminer différents sous-types de syndrome myélodysplasique, en fonction du score IPSS, exprimant fortement

un de ces marqueurs et suivre leur expression au cours du suivi de la maladie. De même que pour les LAM, une étude de l'expression des marqueurs embryonnaires sur chaque sous-population leucocytaires devra être réalisée afin de voir la différence d'expression.

En ce qui concerne le rôle fonctionnel que pourrait jouer les marqueurs embryonnaires dans la Leucémogénèse, une étude de l'inhibition par shRNA des marqueurs SOX2 et NANOG sera réalisée dans les lignées leucémiques et la sous-régulation d'OCT4 trouvée dans les lignées leucémiques sera confirmée dans des cellules CD34⁺ de sangs de cordons ou de cellules souches périphériques. De plus, une étude approfondie sur la dérégulation du facteur OCT4 doit être effectuée. En effet, cette dérégulation peut se faire à travers certaines voies de signalisation tel que la voie MAPK qui est elle-même activée par le facteur de transcription Grb2 (Milella et al. 2001; Ricciardi et al. 2005), la voie JAK/STAT3 qui active deux facteurs de transcription Ref1 et Utl1 qui sont impliqués dans la pluripotence et la différenciation cellulaire (Steensma et al. 2006). Des études préliminaires ont montré qu'il y aurait une corrélation entre les voies de signalisation NOTCH/AKT et SOX2/NANOG. Une étude plus approfondie de ces voies de signalisation et notamment l'implication des voies de signalisation dans les propriétés de Leucémogénèse devra être poursuivie.

Une autre approche serait d'étudier la régulation des antigènes embryonnaires sur le cycle cellulaire. En effet, il est clairement établi qu'une balance finement régulée entre quiescence et progression dans le cycle cellulaire assure le maintien du pool de cellules souches et une production adéquate des lignages différenciés. Une rupture de cet équilibre peut favoriser la formation de maladies dégénératives et de processus tumoraux, tels qu'on les observe au cours du vieillissement (Rimmelé, Zhang, and Ghaffari 2012). Ainsi, dans les cellules souches embryonnaires, OCT4 qui joue un rôle dans le maintien de la pluripotence régulerait la protéine FoxO1 (Boyer et al. 2005), identifiée comme régulateur clé de la destinée des CSE, qui elle-même pourrait coordonner la pluripotence et la régulation du cycle cellulaire (Rimmelé, Zhang, and Ghaffari 2012). De ce fait, il serait intéressant de regarder l'effet de l'inhibition d'OCT4 sur la régulation du cycle cellulaire.

De plus, il serait très intéressant d'étudier la dérégulation d'OCT4 par des mécanismes épigénétiques pouvant être impliqués dans les phénomènes de leucémie aiguë et d'état pré-leucémique. Ainsi, un projet de recherche se déroulant au laboratoire d'Hématologie de Saint-Etienne et faisant l'objet d'une thèse scientifique est actuellement en cours afin d'étudier l'implication des miRNAs (let7c et lin28) dans les propriétés des cellules souches leucémiques (Pelosi et al. 2013; Heo et al. 2008). Une autre façon d'étudier la dérégulation de

ce facteur serait par l'étude du transcriptome car sa caractérisation et sa quantification dans une population donnée permettront d'identifier le gène actif et de déterminer les mécanismes de régulation d'expression du gène ainsi que de définir les réseaux d'expression du gène.

A plus long terme, l'étude de la reprogrammation épigénétique qui pourrait expliquer la dérégulation de l'expression des antigènes embryonnaires dans les leucémies aiguës myéloïdes serait importante car cela nous inviterait à tester la pertinence de ces marqueurs pour l'identification des cellules souches leucémiques et comme cibles thérapeutiques potentielles.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux réalisés au cours de ces quatre années de thèse m'ont permis d'identifier des marqueurs qui peuvent être dédiés à l'identification et à la caractérisation des cellules souches leucémiques résiduelles dans le cas d'une Leucémie Aiguë Myéloïde.

La recherche de la maladie résiduelle est en train de devenir un élément de pronostic important dans les leucémies aiguës et demande d'avoir une grande sensibilité. Actuellement, il est possible d'atteindre une sensibilité de l'ordre de 10^{-4} ou 10^{-5} mais celle-ci dépend de la richesse cellulaire de l'échantillon. Ainsi, l'identification des marqueurs embryonnaires comme étant discriminant dans les cellules souches leucémiques pourrait aider dans le suivi de la maladie résiduelle d'une Leucémie Aiguë Myéloïde.

Durant cette thèse, nous avons pu évaluer le rôle fonctionnel du facteur de transcription OCT4 dans la leucémie aiguë myéloïde et ainsi montrer que sa surexpression entraînerait une dédifférenciation et une prolifération anormale dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes et notamment dans des sous-types spécifiques.

La dérégulation de l'expression de ces antigènes embryonnaires, laquelle se ferait à travers certaines voies de signalisation, montrerait que ces marqueurs seraient à l'origine de la transformation maligne. Cette dérégulation aurait un rôle dans les mécanismes de Leucémogénèse, c'est pourquoi une compréhension plus approfondie de ces mécanismes pourrait conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques offrant de nouvelles perspectives pour améliorer la survie des patients atteints de Leucémie Aiguë Myéloïde.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abramson, S,** RG Miller, and RA Phillips. 1977. “The Identification in Adult Bone Marrow of Pluripotent and Restricted Stem Cells of the Myeloid and Lymphoid Systems.” *The Journal of Experimental Medicine* 145 (6): 1567–79.
- Adolfsson, Jörgen,** Robert Månsson, Natalija Buza-Vidas, Anne Hultquist, Karina Liuba, Christina T. Jensen, David Bryder, et al. 2005. “Identification of Flt3+ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential.” *Cell* 121 (2): 295–306.
- Akashi, Koichi,** David Traver, Toshihiro Miyamoto, and Irving L. Weissman. 2000. “A Clonogenic Common Myeloid Progenitor That Gives Rise to All Myeloid Lineages.” *Nature* 404 (6774): 193–97.
- Amaya, Clarissa N.,** and Brad A. Bryan. 2015. “Enrichment of the Embryonic Stem Cell Reprogramming Factors Oct4, Nanog, Myc, and Sox2 in Benign and Malignant Vascular Tumors.” *BMC Clinical Pathology* 15: 18.
- Andrews, R. G.,** J. W. Singer, and I. D. Bernstein. 1986. “Monoclonal Antibody 12-8 Recognizes a 115-Kd Molecule Present on Both Unipotent and Multipotent Hematopoietic Colony-Forming Cells and Their Precursors.” *Blood* 67 (3): 842–45.
- Anjos-Afonso, Fernando,** and Dominique Bonnet. 2007. “Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1⁺ Cells Define the Most Primitive Progenitors in the Adult Murine Bone Marrow Mesenchymal Compartment.” *Blood* 109 (3): 1298–1306.
- Arber, Daniel A.,** Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, and James W. Vardiman. 2016. “The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia.” *Blood* 127 (20): 2391–2405.
- Asadi, Malek H.,** Seyed J. Mowla, Fardin Fathi, Ahmad Aleyasin, Jamshid Asadzadeh, and Yaser Atlasi. 2011. “OCT4B1, a Novel Spliced Variant of OCT4, Is Highly Expressed in Gastric Cancer and Acts as an Antiapoptotic Factor.” *International Journal of Cancer* 128 (11): 2645–52.

Atlasi, Yaser, Seyed J. Mowla, Seyed A.M. Ziaee, Paul J. Gokhale, and Peter W. Andrews. 2008. "OCT4 Spliced Variants Are Differentially Expressed in Human Pluripotent and Nonpluripotent Cells." *STEM CELLS* 26 (12): 3068–74.

Avilion, Ariel A., Silvia K. Nicolis, Larysa H. Pevny, Lidia Perez, Nigel Vivian, and Robin Lovell-Badge. 2003. "Multipotent Cell Lineages in Early Mouse Development Depend on SOX2 Function." *Genes & Development* 17 (1): 126–40.

B

Bakker, Alexander B. H., Sonja van den Oudenrijn, Arjen Q. Bakker, Nicole Feller, Marja van Meijer, Judith A. Bia, Mandy A. C. Jongeneelen, et al. 2004. "C-Type Lectin-like Molecule-1: A Novel Myeloid Cell Surface Marker Associated with Acute Myeloid Leukemia." *Cancer Research* 64 (22): 8443–50.

Bass, Adam J., Hideo Watanabe, Craig H. Mermel, Soyoung Yu, Sven Perner, Roel G. Verhaak, So Young Kim, et al. 2009. "SOX2 Is an Amplified Lineage Survival Oncogene in Lung and Esophageal Squamous Cell Carcinomas." *Nature Genetics* 41 (11): 1238–42.

Baum, C. M., I L Weissman, A S Tsukamoto, A M Buckle, and B Peault. 1992. "Isolation of a Candidate Human Hematopoietic Stem-Cell Population." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (7): 2804–8.

Becker, A. J., E. A. McCULLOCH, and J. E. Till. 1963. "Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells." *Nature* 197 (February): 452–54.

Bene, M. C., G. Castoldi, W. Knapp, W. D. Ludwig, E. Matutes, A. Orfao, and M. B. van't Veer. 1995. "Proposals for the Immunological Classification of Acute Leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)." *Leukemia* 9 (10): 1783–86.

Béné, Marie-Christine, and Francis Lacombe. 2015. "Place de La Cytométrie En Flux Dans Le Diagnostic et Le Suivi Des Leucémies Aiguës." *Revue Francophone Des Laboratoires*, Hématologie leucémies aiguës, 2015 (471): 35–41.

- Bhatia, Mickie**, Dominique Bonnet, Barbara Murdoch, Olga I. Gan, and John E. Dick. 1998. "A Newly Discovered Class of Human Hematopoietic Cells with SCID-Repopulating Activity." *Nature Medicine* 4 (9): 1038–45.
- Biressi, Stefano**, and Thomas A. Rando. 2010. "Heterogeneity in the Muscle Satellite Cell Population." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21 (8): 845–54.
- Bjerknes, Matthew**, and Hazel Cheng. 2002. "Multipotential Stem Cells in Adult Mouse Gastric Epithelium." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 283 (3): G767–77.
- Bonnet, D.**, and J. E. Dick. 1997. "Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell." *Nature Medicine* 3 (7): 730–37.
- Borggreffe, T.**, and F. Oswald. 2009. "The Notch Signaling Pathway: Transcriptional Regulation at Notch Target Genes." *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (10): 1631–46.
- Borrull, Aurelie**, Stephanie Ghislin, Frederique Deshayes, Jessica Lauriol, Catherine Alcaide-Loridan, and Sandrine Middendorp. 2012. "Nanog and Oct4 Overexpression Increases Motility and Transmigration of Melanoma Cells." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 138 (7): 1145–54.
- Boumahdi, Soufiane**, Gregory Driessens, Gaelle Lapouge, Sandrine Rorive, Dany Nassar, Marie Le Mercier, Benjamin Delatte, et al. 2014. "SOX2 Controls Tumour Initiation and Cancer Stem-Cell Functions in Squamous-Cell Carcinoma." *Nature* 511 (7508): 246–50.
- Bourillot, Pierre-Yves**, Irène Aksoy, Valerie Schreiber, Florence Wianny, Herbert Schulz, Oliver Hummel, Norbert Hubner, and Pierre Savatier. 2009. "Novel STAT3 Target Genes Exert Distinct Roles in the Inhibition of Mesoderm and Endoderm Differentiation in Cooperation with Nanog." *STEM CELLS* 27 (8): 1760–71.
- Bourke, Vincent A.**, Christopher J. Watchman, John D. Reith, Marda L. Jorgensen, Arnaud Dieudonné, and Wesley E. Bolch. 2009. "Spatial Gradients of Blood Vessels and Hematopoietic Stem and Progenitor Cells within the Marrow Cavities of the Human Skeleton." *Blood* 114 (19): 4077–80.

- Boyer, Laurie A.**, Tong Ihn Lee, Megan F. Cole, Sarah E. Johnstone, Stuart S. Levine, Jacob P. Zucker, Matthew G. Guenther, et al. 2005. "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells." *Cell* 122 (6): 947–56.
- Bradley, A.**, M. Evans, M. H. Kaufman, and E. Robertson. 1984. "Formation of Germ-Line Chimaeras from Embryo-Derived Teratocarcinoma Cell Lines." *Nature* 309 (5965): 255–56.
- Bradley, T. R.**, and D. Metcalf. 1966. "The Growth of Mouse Bone Marrow Cells in Vitro." *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 44 (3): 287–99.
- Bryder, D.**, D.J. Rossi, and I.L. Weissman. 2006. "Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell". *American Journal of Pathology* 169 (2):338-46.
- Brown, G.**, C. M. Bunce, and G. R. Guy. 1985. "Sequential Determination of Lineage Potentials during Haemopoiesis." *British Journal of Cancer* 52 (5): 681–86.
- Büchner, Thomas**, Richard F. Schlenk, Markus Schaich, Konstanze Döhner, Rainer Krahlf, Jürgen Krauter, Gerhard Heil, et al. 2012. "Acute Myeloid Leukemia (AML): Different Treatment Strategies Versus a Common Standard Arm—Combined Prospective Analysis by the German AML Intergroup." *Journal of Clinical Oncology* 30 (29): 3604–10.
- Burdon, Tom**, Austin Smith, and Pierre Savatier. 2002. "Signalling, Cell Cycle and Pluripotency in Embryonic Stem Cells." *Trends in Cell Biology* 12 (9): 432–38.
- Burt, Richard K.**, Yvonne Loh, William Pearce, Nirat Beohar, Walter G. Barr, Robert Craig, Yanting Wen, Jonathan A. Rapp, and John Kessler. 2008. "Clinical Applications of Blood-Derived and Marrow-Derived Stem Cells for Nonmalignant Diseases." *JAMA* 299 (8): 925–36.

C

- Calhoun, John D.**, Raj R. Rao, Susanne Warrenfeltz, Romdhane Rekaya, Stephen Dalton, John McDonald, and Steven L. Stice. 2004. "Transcriptional Profiling of Initial Differentiation Events in Human Embryonic Stem Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323 (2): 453–64.

- Campo, Elias**, Steven H. Swerdlow, Nancy L. Harris, Stefano Pileri, Harald Stein, Elaine S. Jaffe. 2011. "The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications". *Blood* 117 (19): 5019-32.
- Capela, Alexandra**, and Sally Temple. 2002. "LeX/ssea-1 Is Expressed by Adult Mouse CNS Stem Cells, Identifying Them as Nonependymal." *Neuron* 35 (5): 865–75.
- Capela, Alexandra**, and Sally Temple. 2006. "LeX Is Expressed by Principle Progenitor Cells in the Embryonic Nervous System, Is Secreted into Their Environment and Binds Wnt-1." *Developmental Biology* 291 (2): 300–313.
- Carrasco-Garcia, Estefania**, Juliana C Santos, Idoia Garcia, Mitsue Brianti, Mikel García-Puga, José Jr Pedrazzoli, Ander Matheu, and Marcelo L Ribeiro. 2016. "Paradoxical Role of SOX2 in Gastric Cancer." *American Journal of Cancer Research* 6 (4): 701–13.
- Cartwright RA**, Staines A. 1992. Acute leukemias, epidemiology of haematological disease part I In : Fleming AT ed, *Baillere's Clinical Haematology* 1992 ; 5 : 1-26.
- Cauffman, Greet**, Inge Liebaers, André Van Steirteghem, and Hilde Van de Velde. 2006. "POU5F1 Isoforms Show Different Expression Patterns in Human Embryonic Stem Cells and Preimplantation Embryos." *STEM CELLS* 24 (12): 2685–91.
- Chambers, Ian**, Douglas Colby, Morag Robertson, Jennifer Nichols, Sonia Lee, Susan Tweedie, and Austin Smith. 2003. "Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells." *Cell* 113 (5): 643–55.
- Chang, Wen-Wei**, Chien Hsin Lee, Peishan Lee, Juway Lin, Chun-Wei Hsu, Jung-Tung Hung, Jin-Jin Lin, et al. 2008. "Expression of Globo H and SSEA3 in Breast Cancer Stem Cells and the Involvement of Fucosyl Transferases 1 and 2 in Globo H Synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (33): 11667–72.
- Chao, Mark P.**, Andrew J. Gentles, Susmita Chatterjee, Feng Lan, Andreas Reinisch, M. Ryan Corces, Seethu Xavy, et al. 2017. "Human AML-iPSCs Reacquire Leukemic Properties after Differentiation and Model Clonal Variation of Disease." *Cell Stem Cell* 20 (3): 329–344.e7.

- Cheng, Tao**, Neil Rodrigues, Hongmei Shen, Yong-guang Yang, David Dombkowski, Megan Sykes, and David T. Scadden. 2000. "Hematopoietic Stem Cell Quiescence Maintained by p21^{cip1/waf1}." *Science* 287 (5459): 1804–8.
- Chew, Joon-Lin**, Yui-Han Loh, Wensheng Zhang, Xi Chen, Wai-Leong Tam, Leng-Siew Yeap, Pin Li, et al. 2005. "Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells." *Molecular and Cellular Biology* 25 (14): 6031–46.
- Chotinantakul, Kamonnaree**, and Wilairat Leeanansaksiri. 2012. "Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways." *Bone Marrow Research* 2012.
- Chung, Young**, Irina Klimanskaya, Sandy Becker, Joel Marh, Shi-Jiang Lu, Julie Johnson, Lorraine Meisner, and Robert Lanza. 2006. "Embryonic and Extraembryonic Stem Cell Lines Derived from Single Mouse Blastomeres." *Nature* 439 (7073): 216–19.
- Clarke, Michael F.**, and Michael W. Becker. 2006. "Stem Cells: The Real Culprits in Cancer?" *Scientific American* 295 (1): 52–59.
- Clarke, Michael F.**, and Margaret Fuller. 2006. "Stem Cells and Cancer: Two Faces of Eve." *Cell* 124 (6): 1111–15.
- Corces-Zimmerman, M. Ryan**, Wan-Jen Hong, Irving L. Weissman, Bruno C. Medeiros, and Ravindra Majeti. 2014. "Preleukemic Mutations in Human Acute Myeloid Leukemia Affect Epigenetic Regulators and Persist in Remission." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (7): 2548–53.
- Coulombel, Laure**. 2003. "Cellules souches tissulaires adultes : seing is not being." *médecine/sciences* 19 (6–7): 683–94.
- Cumano, Ana**, and Isabelle Godin. 2007. "Ontogeny of the Hematopoietic System." *Annual Review of Immunology* 25 (1): 745–85.
- Curry, J. L.**, and J. J. Trentin. 1967. "HEMOPOIETIC SPLEEN COLONY STUDIES." *The Journal of Experimental Medicine* 126 (5): 819–32.

D-E

- Dao, M. A.,** and J. A. Nolta. 2000. "CD34: To Select or Not to Select? That Is the Question." *Leukemia* 14 (5): 773–76.
- D’Costa, S.,** and J. N. Petite. 2004. "Characterization of Stage-Specific Embryonic Antigen-1 (SSEA-1) Expression during Early Development of the Turkey Embryo." *International Journal of Developmental Biology* 43 (4): 349–56.
- De Vos, J.,** S. Assou, S. Tondeur, M. Dijon, and S. Hamamah. 2009. "Les Cellules Souches Embryonnaires Humaines : De La Transgression de L’embryon Humain À La Médecine Régénératrice de Demain." *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 37 (7): 620–26.
- Delaunay J.,** Recher C., Pigneux A. et al. 2011. Addition of Gemtuzumab Ozogamycin to Chemotherapy Improves Event-Free Survival but Not Overall Survival of AML Patients with Intermediate Cytogenetics Not Eligible for Allogeneic Transplantation. Results of the GOELAMS AML 2006 IR Study. *Blood* 2011; ASH Annual Meeting Abstract n°79 118:79.
- Del Principe, Maria Ilaria,** Francesco Buccisano, Luca Maurillo, Giuseppe Sconocchia, Mariagiovanna Cefalo, Maria Irno Consalvo, Chiara Sarlo, et al. 2016. "Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia of Adults: Determination, Prognostic Impact and Clinical Applications." *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 8 (1).
- Delogu, Alessio,** Alexandra Schebesta, Qiong Sun, Katharina Aschenbrenner, Thomas Perlot, and Meinrad Busslinger. 2006. "Gene Repression by Pax5 in B Cells Is Essential for Blood Cell Homeostasis and Is Reversed in Plasma Cells." *Immunity* 24 (3): 269–81.
- Doan, P. L.,** and J. P. Chute. 2012. "The Vascular Niche: Home for Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells." *Leukemia* 26 (1): 54–62.
- Dodd, J.,** and T. M. Jessell. 1986. "Cell Surface Glycoconjugates and Carbohydrate-Binding Proteins: Possible Recognition Signals in Sensory Neurone Development." *Journal of Experimental Biology* 124 (1): 225–38.

- Doetschman, Thomas C.**, Harald Eistetter, Margot Katz, Werner Schmidt, and Rolf Kemler. 1985. “The *in Vitro* Development of Blastocyst-Derived Embryonic Stem Cell Lines: Formation of Visceral Yolk Sac, Blood Islands and Myocardium.” *Development* 87 (1): 27–45.
- Döhner, Hartmut**, Elihu Estey, David Grimwade, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Hervé Dombret, et al. 2017. “Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel.” *Blood* 129 (4): 424–47.
- Dombret, Hervé**, Claude Chastang, Pierre Fenaux, Josy Reiffers, Dominique Bordessoule, Réda Bouabdallah, Franco Mandelli, et al. 1995. “A Controlled Study of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Elderly Patients after Treatment for Acute Myelogenous Leukemia.” *New England Journal of Medicine* 332 (25): 1678–83.
- Drew, Erin**, Claudia S. Huettner, Daniel G. Tenen, and Kelly M. McNagny. 2005. “CD34 Expression by Mast Cells: Of Mice and Men.” *Blood* 106 (5): 1885–87.
- Du, Zhanhui**, Deyong Jia, Shangming Liu, Fuwu Wang, Gang Li, Yanmin Zhang, Xinmin Cao, Eng-Ang Ling, and Aijun Hao. 2009. “Oct4 Is Expressed in Human Gliomas and Promotes Colony Formation in Glioma Cells.” *Glia* 57 (7): 724–33. doi:10.1002/glia.20800.
- Eberle, Irina**, Birgit Pless, Miriam Braun, Theo Dingermann, and Rolf Marschalek. 2010. “Transcriptional Properties of Human NANOG1 and NANOG2 in Acute Leukemic Cells.” *Nucleic Acids Research* 38 (16): 5384–95.
- Efroni, Sol**, Radharani Duttagupta, Jill Cheng, Hesam Dehghani, Daniel J. Hoepfner, Chandranu Dash, David P. Bazett-Jones, et al. 2008. “Global Transcription in Pluripotent Embryonic Stem Cells.” *Cell Stem Cell* 2 (5): 437–47.
- Encinas, Juan Manuel**, and Grigori Enikolopov. 2008. “Identifying and Quantitating Neural Stem and Progenitor Cells in the Adult Brain.” *Methods in Cell Biology*, Fluorescent Proteins, 85 (January): 243–72.
- Eramo, A.**, F. Lotti, G. Sette, E. Pilozzi, M. Biffoni, A. Di Virgilio, C. Conticello, L. Ruco, C. Peschle, and R. De Maria. 2007. “Identification and Expansion of the Tumorigenic Lung Cancer Stem Cell Population.” *Cell Death & Differentiation* 15 (3): 504–14.

Estey, Elihu, and Hartmut Döhner. 2006. "Acute Myeloid Leukaemia." *The Lancet* 368 (9550): 1894–1907.

Evans, M. J., and M. H. Kaufman. 1981. "Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos." *Nature* 292 (5819): 154–56.

F-G

Farashahi Yazd, Ehsan, Mahmood Reza Rafiee, Masoud Soleimani, Mahmood Tavallaei, Maryam Kabir Salmani, and Seyed Javad Mowla. 2011. "OCT4B1, a Novel Spliced Variant of OCT4, Generates a Stable Truncated Protein with a Potential Role in Stress Response." *Cancer Letters* 309 (2): 170–75.

Fargeas, C. A., W. B. Huttner, and D. Corbeil. 2007. "Nomenclature of Prominin-1 (CD133) Splice Variants – an Update." *Tissue Antigens* 69 (6): 602–6.

Ferone, Giustina, Ji-Ying Song, Kate D. Sutherland, Rajith Bhaskaran, Kim Monkhurst, Jan-Paul Lambooi, Natalie Proost, Gaetano Gargiulo, and Anton Berns. 2016. "SOX2 Is the Determining Oncogenic Switch in Promoting Lung Squamous Cell Carcinoma from Different Cells of Origin." *Cancer Cell* 30 (4): 519–32.

Fina, L., H. V. Molgaard, D. Robertson, N. J. Bradley, P. Monaghan, D. Delia, D. R. Sutherland, M. A. Baker, and M. F. Greaves. 1990. "Expression of the CD34 Gene in Vascular Endothelial Cells." *Blood* 75 (12): 2417–26.

Finan, Amanda, Matthew Kiedrowski, Benjamin A. Turturice, Nikolai A. Sopko, and Marc S. Penn. 2012. "Cardiac Pressure Overload Initiates a Systemic Stem Cell Response." *Cytotherapy* 14 (8): 983–93.

Fiúza, Ulla-Maj, and Alfonso Martinez Arias. 2007. "Cell and Molecular Biology of Notch." *Journal of Endocrinology* 194 (3): 459–74.

Ford, C. E., J. L. Hamerton, D. W. H. Barnes, and J. F. Loutit. 1956. "Cytological Identification of Radiation-Chimæras." *Nature* 177 (4506): 452–54.

G Ailhaud, P Grimaldi, and and R. Négrel. 1992. "Cellular and Molecular Aspects of Adipose Tissue Development." *Annual Review of Nutrition* 12 (1): 207–33.

- Garros-Regulez, Laura**, Idoia Garcia, Estefania Carrasco-Garcia, Aquilino Lantero, Paula Aldaz, Leire Moreno-Cugnon, Olatz Arrizabalaga, et al. 2016. "Targeting SOX2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma." *Frontiers in Oncology* 6 (October).
- Gazouli, Maria**, Maria G. Roubelakis, George E. Theodoropoulos, Joanna Papailiou, Anna Vaiopoulou, Kalliopi I. Pappa, Nikolaos Nikiteas, and Nicholas P. Anagnou. 2012. "OCT4 Spliced Variant OCT4B1 Is Expressed in Human Colorectal Cancer." *Molecular Carcinogenesis* 51 (2): 165–73.
- George, Tracy**, and David R. Czuchlewski. 2016. "The WHO is New: 2016 Updates to the Classification of Myeloid Neoplasms". *The Hematologist* Volume 13 Issue 5.
- Gishizky, Mikhail L.** 1995. "Chapter 26. Tyrosine Kinase Induced Mitogenesis Breaking the Link With Cancer." *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 30 (January): 247–53.
- Goardon, Nicolas**, Emanuele Marchi, Ann Atzberger, Lynn Quek, Anna Schuh, Shamit Soneji, Petter Woll, et al. 2011. "Coexistence of LMPP-like and GMP-like Leukemia Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia." *Cancer Cell* 19 (1): 138–52.
- Graham, Victoria**, Jane Khudyakov, Pamela Ellis, and Larysa Pevny. 2003. "SOX2 Functions to Maintain Neural Progenitor Identity." *Neuron* 39 (5): 749–65.
- Grimwade, David**, and Sylvie D. Freeman. 2014. "Defining Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia: Which Platforms Are Ready for 'prime Time'?" *Blood* 124 (23): 3345–55.
- Grimwade, Lizz**, Emma Gudgin, David Bloxham, Graham Bottley, George Vassiliou, Brian Huntly, Mike A. Scott, and Wendy N. Erber. 2012. "Detection of Cytoplasmic Nucleophosmin Expression by Imaging Flow Cytometry." *Cytometry Part A* 81A (10): 896–900.
- Gripp, Karen W.**, Katherine M. Robbins, Nara L. Sobreira, P. Dane Witmer, Lynne M. Bird, Kristiina Avela, Outi Makitie, et al. 2015. "Truncating Mutations in the Last Exon of NOTCH3 Cause Lateral Meningocele Syndrome." *American Journal of Medical Genetics Part A* 167 (2): 271–81.

Grisolano, Jay L., Julie O’Neal, Jennifer Cain, and Michael H. Tomasson. 2003. “An Activated Receptor Tyrosine Kinase, TEL/PDGFβR, Cooperates with AML1/ETO to Induce Acute Myeloid Leukemia in Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16): 9506–11.

Gubbay, John, Jérôme Collignon, Peter Koopman, Blanche Capel, Androulla Economou, Andrea Münsterberg, Nigel Vivian, Peter Goodfellow, and Robin Lovell-Badge. 1990. “A Gene Mapping to the Sex-Determining Region of the Mouse Y Chromosome Is a Member of a Novel Family of Embryonically Expressed Genes.” *Nature* 346 (6281): 245–50.

H-I

H, Brincker. 1985. “Estimate of Overall Treatment Results in Acute Nonlymphocytic Leukemia Based on Age-Specific Rates of Incidence and of Complete Remission.” *Cancer Treatment Reports* 69 (1): 5–11.

Habets, Roger A. J., Arjan J. Groot, Sanaz Yahyanejad, Kittichoat Tiyanont, Stephen C. Blacklow, and Marc Vooijs. 2015. “Human NOTCH2 Is Resistant to Ligand-Independent Activation by Metalloprotease Adam17.” *The Journal of Biological Chemistry* 290 (23): 14705–16.

Hanekamp, Diana, Jacqueline Cloos, and Gerrit Jan Schuurhuis. 2017. “Leukemic Stem Cells: Identification and Clinical Application.” *International Journal of Hematology* 105 (5): 549–57.

Hanna, Lynn A., Ruth K. Foreman, Illya A. Tarasenko, Daniel S. Kessler, and Patricia A. Labosky. 2002. “Requirement for Foxd3 in Maintaining Pluripotent Cells of the Early Mouse Embryo.” *Genes & Development* 16 (20): 2650–61.

Hart, Adam H., Lynne Hartley, Marilyn Ibrahim, and Lorraine Robb. 2004. “Identification, Cloning and Expression Analysis of the Pluripotency Promoting Nanog Genes in Mouse and Human.” *Developmental Dynamics* 230 (1): 187–98.

Harris NL, Jaffe EL, Stein H, Vardiman JW, Diebold J, Müller-Hermelink HK, Flandrin G. 2001. Pathology and Genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France: IARC Press.

- Heo, Inha**, Chirlmin Joo, Jun Cho, Minju Ha, Jinju Han, and V. Narry Kim. 2008. “Lin28 Mediates the Terminal Uridylation of Let-7 Precursor MicroRNA.” *Molecular Cell* 32 (2): 276–84.
- Hochedlinger, Konrad**, Yasuhiro Yamada, Caroline Beard, and Rudolf Jaenisch. 2005. “Ectopic Expression of Oct-4 Blocks Progenitor-Cell Differentiation and Causes Dysplasia in Epithelial Tissues.” *Cell* 121 (3): 465–77.
- Hoei-Hansen, Christina E**, Sigrid M Kraggerud, Vera M Abeler, Janne Kærn, Ewa Rajpert-De Meyts, and Ragnhild A Lothe. 2007. “Ovarian Dysgerminomas Are Characterised by Frequent KIT Mutations and Abundant Expression of Pluripotency Markers.” *Molecular Cancer* 6 (February): 12.
- Huang, Xinxin**, Man-Ryul Lee, Scott Cooper, Gao Hangoc, Ki-Sung Hong, Hyung-Min Chung, and Hal E. Broxmeyer. 2016. “Activation of OCT4 Enhances Ex Vivo Expansion of Human Cord Blood Hematopoietic Stem and Progenitor Cells by Regulating HOXB4 Expression.” *Leukemia* 30 (1): 144–53.
- Hwang, Keumrock**, Chan-Jeoung Park, Seongsoo Jang, Hyun-Sook Chi, Dae-Young Kim, Jung-Hee Lee, Je Hwan Lee, Kyoo Hyung Lee, Ho-Joon Im, and Jong-Jin Seo. 2012. “Flow Cytometric Quantification and Immunophenotyping of Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia.” *Annals of Hematology* 91 (10): 1541–46.
- Hyslop, Louise**, Miodrag Stojkovic, Lyle Armstrong, Theresia Walter, Petra Stojkovic, Stefan Przyborski, Mary Herbert, Alison Murdoch, Tom Strachan, and Majlinda Lako. 2005. “Downregulation of NANOG Induces Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Extraembryonic Lineages.” *STEM CELLS* 23 (8): 1035–43.
- Ivanova, Natalia**, Radu Dobrin, Rong Lu, Iulia Kotenko, John Levorse, Christina DeCoste, Xenia Schafer, Yi Lun, and Ihor R. Lemischka. 2006. “Dissecting Self-Renewal in Stem Cells with RNA Interference.” *Nature* 442 (7102): 533–38.

J-K

- Janes, P. W.**, R. J. Daly, A. deFazio, and R. L. Sutherland. 1994. “Activation of the Ras Signalling Pathway in Human Breast Cancer Cells Overexpressing erbB-2.” *Oncogene* 9 (12): 3601–8.

- Ji, Junfeng**, Tamra E. Werbowetski-Ogilvie, Bonan Zhong, Seok-Ho Hong, and Mickie Bhatia. 2009. “Pluripotent Transcription Factors Possess Distinct Roles in Normal versus Transformed Human Stem Cells.” *PLoS ONE* 4 (11): e8065.
- Jones, D. Leanne**, and Amy J. Wagers. 2008. “No Place like Home: Anatomy and Function of the Stem Cell Niche.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (1): 11–21.
- Jordan, Craig T.** 2007. “The Leukemic Stem Cell.” *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 20 (1): 13–18.
- Kageyama, Ryoichiro**, and Toshiyuki Ohtsuka. 1999. “The Notch-Hes Pathway in Mammalian Neural Development.” *Cell Research* 9 (3): 179–88.
- Kaltz, Nikolas**, Jochen Ringe, Christina Holzwarth, Pierre Charbord, Markus Niemeyer, Volker R. Jacobs, Christian Peschel, Thomas Häupl, and Robert A. J. Oostendorp. 2010. “Novel Markers of Mesenchymal Stem Cells Defined by Genome-Wide Gene Expression Analysis of Stromal Cells from Different Sources.” *Experimental Cell Research, Special Reviews on Stem Cell Differentiation and Cellular Reprogramming*, 316 (16): 2609–17.
- Katsura, Yoshimoto.** 2002. “Redefinition of Lymphoid Progenitors.” *Nature Reviews Immunology* 2 (2): 127–32.
- Kawamoto, Hiroshi**, and Yoshimoto Katsura. 2009. “A New Paradigm for Hematopoietic Cell Lineages: Revision of the Classical Concept of the Myeloid–lymphoid Dichotomy.” *Trends in Immunology* 30 (5): 193–200.
- Kelberman, Daniel**, Karine Rizzoti, Ariel Avilion, Maria Bitner-Glindzicz, Stefano Cianfarani, Julie Collins, W. Kling Chong, et al. 2006. “Mutations within Sox2/SOX2 Are Associated with Abnormalities in the Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis in Mice and Humans.” *Journal of Clinical Investigation* 116 (9): 2442–55.
- Kersten, Bas**, Matthijs Valkering, Rolf Wouters, Rosa van Amerongen, Diana Hanekamp, Zinia Kwidama, Peter Valk, et al. 2016. “CD45RA, a Specific Marker for Leukaemia Stem Cell Sub-Populations in Acute Myeloid Leukaemia.” *British Journal of Haematology* 173 (2): 219–35.

- Khwaja, Asim**, Magnus Bjorkholm, Rosemary E. Gale, Ross L. Levine, Craig T. Jordan, Gerhard Ehninger, Clara D. Bloomfield, et al. 2016. “Acute Myeloid Leukaemia.” *Nature Reviews Disease Primers* 2 (March): nrdp201610.
- Kieffer, Emmanuelle**, Sandra Kuntz, and Stéphane Viville. 2010. “Tour d’horizon des lignées de cellules souches pluripotentes.” *médecine/sciences* 26 (10): 848–54.
- Kim, Jeong Beom**, Boris Greber, Marcos J. Araúzo-Bravo, Johann Meyer, Kook In Park, Holm Zaehres, and Hans R. Schöler. 2009. “Direct Reprogramming of Human Neural Stem Cells by OCT4.” *Nature* 461 (7264): 649–53.
- Kim, Jonghwan**, Jianlin Chu, Xiaohua Shen, Jianlong Wang, and Stuart H. Orkin. 2008. “An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells.” *Cell* 132 (6).
- Kim, Jung Sun**, Jiha Kim, Byung Soo Kim, Hee Yong Chung, Young Yiul Lee, Choon-Sik Park, Young Seek Lee, Young Han Lee, and Il Yup Chung. 2005. “Identification and Functional Characterization of an Alternative Splice Variant within the Fourth Exon of Human Nanog.” *Experimental & Molecular Medicine* 37 (6): 601–7.
- Klimanskaya, Irina**, Young Chung, Sandy Becker, Shi-Jiang Lu, and Robert Lanza. 2006. “Human Embryonic Stem Cell Lines Derived from Single Blastomeres.” *Nature* 444 (7118): 481–85.
- Kilmanskaya, Irina**, Young Chung, Sandy Becker, Shi-Jiang Lu, and Robert Lanza. 2007. “Derivation of Human Embryonic Stem Cells from Single Blastomeres.” *Nature Protocols* 2 (8): 1963–72.
- Kode, Aruna**, John S. Manavalan, Ioanna Mosialou, Govind Bhagat, Chozha V. Rathinam, Na Luo, Hossein Khiabani, et al. 2014. “Leukemogenesis Induced by an Activating β -Catenin Mutation in Osteoblasts.” *Nature* 506 (7487): 240–44.
- Kondo, Motonari**, David C. Scherer, Toshihiro Miyamoto, Angela G. King, Koichi Akashi, Kazuo Sugamura, and Irving L. Weissman. 2000. “Cell-Fate Conversion of Lymphoid-Committed Progenitors by Instructive Actions of Cytokines.” *Nature* 407 (6802): 383–86.

- Kondo, Motonari**, Irving L. Weissman, and Koichi Akashi. 1997. “Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow.” *Cell* 91 (5): 661–72.
- Krause, D. S.**, M. J. Fackler, C. I. Civin, and W. S. May. 1996. “CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility.” *Blood* 87 (1): 1–13.
- Kucia, M.**, M. Halasa, M. Wysoczynski, M. Baskiewicz-Masiuk, S. Moldenhawer, E. Zuba-Surma, R. Czajka, W. Wojakowski, B. Machalinski, and M. Z. Ratajczak. 2006. “Morphological and Molecular Characterization of Novel Population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ Very Small Embryonic-like Cells Purified from Human Cord Blood – Preliminary Report.” *Leukemia* 21 (2): 297–303.
- Kucia, M.**, R. Reca, F. R. Campbell, E. Zuba-Surma, M. Majka, J. Ratajczak, and M. Z. Ratajczak. 2006. “A Population of Very Small Embryonic-like (VSEL) CXCR4+SSEA-1+Oct-4+ Stem Cells Identified in Adult Bone Marrow.” *Leukemia* 20 (5): 857–69.
- Kuroda, Yasumasa**, Masaaki Kitada, Shohei Wakao, Kouki Nishikawa, Yukihiro Tanimura, Hideki Makinoshima, Makoto Goda, et al. 2010. “Unique Multipotent Cells in Adult Human Mesenchymal Cell Populations.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19): 8639–43.

L

- Larsson, Jonas**, Ulrika Blank, Hildur Helgadóttir, Jon Mar Björnsson, Mats Ehinger, Marie-José Goumans, Xiaolong Fan, Per Levéen, and Stefan Karlsson. 2003. “TGF- β Signaling-deficient Hematopoietic Stem Cells Have Normal Self-Renewal and Regenerative Ability in Vivo despite Increased Proliferative Capacity in Vitro.” *Blood* 102 (9): 3129–35.
- Lee, Jeong-Heon**, Suzanne R.L. Hart, and David G. Skalnik. 2004. “Histone Deacetylase Activity Is Required for Embryonic Stem Cell Differentiation.” *Genesis* 38 (1): 32–38.
- Lee, Jong-Hee**, Sarah Laronde, Tony J. Collins, Zoya Shapovalova, Borko Tanasijevic, Jamie D. McNicol, Aline Fiebig-Comyn, et al. 2017. “Lineage-Specific Differentiation Is Influenced by State of Human Pluripotency.” *Cell Reports* 19 (1): 20–35.

- Lee, Jungwoon**, Hye Kyoung Kim, Jeung-Yon Rho, Yong-Mahn Han, and Jungho Kim. 2006. "The Human OCT-4 Isoforms Differ in Their Ability to Confer Self-Renewal." *Journal of Biological Chemistry* 281 (44): 33554–65.
- Lemieux, M. E.**, V. I. Rebel, P. M. Lansdorp, and C. J. Eaves. 1995. "Characterization and Purification of a Primitive Hematopoietic Cell Type in Adult Mouse Marrow Capable of Lymphomyeloid Differentiation in Long-Term Marrow 'switch' cultures." *Blood* 86 (4): 1339–47.
- Lemma, Silvia**, Sofia Avnet, Manuela Salerno, Tokuhiro Chano, and Nicola Baldini. 2016. "Identification and Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis of Cancer Stem Cells." *PloS One* 11 (2): e0149481.
- Levina, Vera**, Adele M. Marrangoni, Richard DeMarco, Elieser Gorelik, and Anna E. Lokshin. 2008. "Drug-Selected Human Lung Cancer Stem Cells: Cytokine Network, Tumorigenic and Metastatic Properties." *PLoS ONE* 3 (8): e0003077.
- Lewis, J. P.**, and F. E. Trobaugh. 1964. "HAEMATOPOIETIC STEM CELLS." *Nature* 204 (November): 589–90.
- Li, Han**, Manuel Collado, Aranzazu Villasante, Ander Matheu, Cian J. Lynch, Marta Cañamero, Karine Rizzoti, et al. 2012. "p27Kip1 Directly Represses Sox2 during Embryonic Stem Cell Differentiation." *Cell Stem Cell* 11 (6): 845–52.
- Lim, Linda Shushan**, Yui-Han Loh, Weiwei Zhang, Yixun Li, Xi Chen, Yinan Wang, Manjiri Bakre, Huck-Hui Ng, and Lawrence W. Stanton. 2007. "Zic3 Is Required for Maintenance of Pluripotency in Embryonic Stem Cells." *Molecular Biology of the Cell* 18 (4): 1348–58.
- Lin, Ting**, Yan-Qing Ding, and Jian-Ming Li. 2012. "Overexpression of Nanog Protein Is Associated with Poor Prognosis in Gastric Adenocarcinoma." *Medical Oncology* 29 (2): 878–85.
- Ling, Gui-Qin**, Dong-Bo Chen, Bao-Qing Wang, and Lan-Sheng Zhang. 2012. "Expression of the Pluripotency Markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in Human Breast Cancer Cell Lines." *Oncology Letters* 4 (6): 1264–68.

Liu, Y, H Cheng, S Gao, X Lu, F He, L Hu, D Hou, et al. 2014. “Reprogramming of MLL-AF9 Leukemia Cells into Pluripotent Stem Cells.” *Leukemia* 28 (5): 1071–80.

Liu, Ying, Soojung Shin, Xianmin Zeng, Ming Zhan, Rodolfo Gonzalez, Franz-Josef Mueller, Catherine M Schwartz, et al. 2006. “Genome Wide Profiling of Human Embryonic Stem Cells (hESCs), Their Derivatives and Embryonal Carcinoma Cells to Develop Base Profiles of U.S. Federal Government Approved hESC Lines.” *BMC Developmental Biology* 6 (May): 20.

Loh, Yuin-Han, Qiang Wu, Joon-Lin Chew, Vinsensius B. Vega, Weiwei Zhang, Xi Chen, Guillaume Bourque, et al. 2006. “The Oct4 and Nanog Transcription Network Regulates Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells.” *Nature Genetics* 38 (4): 431–40.

Luc, Sidinh, Natalija Buza-Vidas, and Sten Eirik W. Jacobsen. 2008. “Delineating the Cellular Pathways of Hematopoietic Lineage Commitment.” *Seminars in Immunology* 20 (4): 213–20.

M

Mao, Xing-gang, Xiang Zhang, Xiao-yan Xue, Geng Guo, Peng Wang, Wei Zhang, Zhou Fei, Hai-ning Zhen, Si-wei You, and Hao Yang. 2009. “Brain Tumor Stem-Like Cells Identified by Neural Stem Cell Marker CD15.” *Translational Oncology* 2 (4): 247–57.

Marson, Alexander, Stuart S. Levine, Megan F. Cole, Garrett M. Frampton, Tobias Brambrink, Sarah Johnstone, Matthew G. Guenther, et al. 2008. “Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells.” *Cell* 134 (3): 521–33.

Martelli, Alberto M., Camilla Evangelisti, Francesca Chiarini, and James A. McCubrey. 2010. “The Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR Signaling Network as a Therapeutic Target in Acute Myelogenous Leukemia Patients.” *Oncotarget* 1 (2): 89–103.

Martin, G R. 1981. “Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12): 7634–38.

- Masaki, Hisaharu**, Tomohiro Nishida, Shigetaka Kitajima, Kinji Asahina, and Hirobumi Teraoka. 2007. “Developmental Pluripotency-Associated 4 (DPPA4) Localized in Active Chromatin Inhibits Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation into a Primitive Ectoderm Lineage.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (45): 33034–42.
- Matoba, Ryo**, Hitoshi Niwa, Shinji Masui, Satoshi Ohtsuka, Mark G. Carter, Alexei A. Sharov, and Minoru S. H. Ko. 2006. “Dissecting Oct3/4-Regulated Gene Networks in Embryonic Stem Cells by Expression Profiling.” *PLOS ONE* 1 (1): e26.
- Meshorer, Eran**, Dhananjay Yellajoshula, Eric George, Peter J. Scambler, David T. Brown, and Tom Misteli. 2006. “Hyperdynamic Plasticity of Chromatin Proteins in Pluripotent Embryonic Stem Cells.” *Developmental Cell* 10 (1): 105–16.
- Milella, Michele**, Steven M. Kornblau, Zeev Estrov, Bing Z. Carter, Hélène Lapillonne, David Harris, Marina Konopleva, Shourong Zhao, Elihu Estey, and Michael Andreeff. 2001. “Therapeutic Targeting of the MEK/MAPK Signal Transduction Module in Acute Myeloid Leukemia.” *Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 851–59.
- Mirzaei, Mohammad Reza**, Mehdi Mahmoodi, Gholamhossein Hassanshahi, and Zahra Ahmadi. 2017. “Down-Regulation of Anti-Apoptotic Genes in Tumor Cell Lines Is Facilitated by Suppression of OCT4B1.” *Advances in Medical Sciences* 62 (1): 97–102.
- Mitsui, Kaoru**, Yoshimi Tokuzawa, Hiroaki Itoh, Kohichi Segawa, Mirei Murakami, Kazutoshi Takahashi, Masayoshi Maruyama, Mitsuyo Maeda, and Shinya Yamanaka. 2003. “The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells.” *Cell* 113 (5): 631–42.
- MK, Harishankar**, Sharon Prince, A. Mathan Mohan, K. Vinod Krishnan, and Ariketh Devi. 2016. “Association of Notch4 with Metastasis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma.” *Life Sciences* 156 (July): 38–46.
- Moshaver, Bijan**, Anna van Rhenen, Angèle Kelder, Marjolein van der Pol, Monique Terwijn, Costa Bachas, August H. Westra, Gert J. Ossenkoppele, Sonja Zweegman, and Gerrit Jan Schuurhuis. 2008. “Identification of a Small Subpopulation of Candidate Leukemia-Initiating Cells in the Side Population of Patients with Acute Myeloid Leukemia.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (12): 3059–67.

N

- Nakamura, Y.**, H. Komano, and H. Nakauchi. 1993. "Two Alternative Forms of cDNA Encoding CD34." *Experimental Hematology* 21 (2): 236–42.
- Nakano, T.**, H. Kodama, and T. Honjo. 1994. "Generation of Lymphohematopoietic Cells from Embryonic Stem Cells in Culture." *Science* 265 (5175): 1098–1101.
- Nakatake, Yuhki**, Nobutaka Fukui, Yuko Iwamatsu, Shinji Masui, Kadue Takahashi, Rika Yagi, Kiyohito Yagi, et al. 2006. "Klf4 Cooperates with Oct3/4 and Sox2 To Activate the Lefty1 Core Promoter in Embryonic Stem Cells." *Molecular and Cellular Biology* 26 (20): 7772–82.
- Navarro, Pablo**, Nicola Festuccia, Douglas Colby, Alessia Gagliardi, Nicholas P Mullin, Wensheng Zhang, Violetta Karwacki-Neisius, et al. 2012. "OCT4/SOX2-Independent Nanog Autorepression Modulates Heterogeneous Nanog Gene Expression in Mouse ES Cells." *The EMBO Journal* 31 (24): 4547–62.
- NEET**, MbBSdost. 2017. "Are Stem Cells Well Named?]. Rey A, Médecine Sciences : M/S - ;19(0)645. *MBBSdost NEET*. Accessed June 20. <http://mbbsdost.com/Are-stem-cells-well-named-Me-decine-sciences-M-S-Rey-A---pubmed/15095206>.
- Network**, The Cancer Genome Atlas Research. 2013. "Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia." *New England Journal of Medicine* 368 (22): 2059–74.
- Nichols, J**, B Zevnik, K Anastassiadis, H Niwa, D Klewe-Nebenius, I Chambers, H Schöler, and A Smith. 1998. "Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4." *Cell* 95 (3): 379–91.
- Nishikawa, S. I.**, S. Nishikawa, M. Hirashima, N. Matsuyoshi, and H. Kodama. 1998. "Progressive Lineage Analysis by Cell Sorting and Culture Identifies FLK1+VE-Cadherin+ Cells at a Diverging Point of Endothelial and Hemopoietic Lineages." *Development* 125 (9): 1747–57.
- NIU, CHAO SHI**, YANG YANG, and CHUAN-DONG CHENG. 2013. "MiR-134 Regulates the Proliferation and Invasion of Glioblastoma Cells by Reducing Nanog Expression." *International Journal of Oncology* 42 (5): 1533–40.

- Niwa, H.** 2001. “Molecular Mechanism to Maintain Stem Cell Renewal of ES Cells.” *Cell Structure and Function* 26 (3): 137–48.
- Niwa, H., J. Miyazaki, and A. G. Smith.** 2000. “Quantitative Expression of Oct-3/4 Defines Differentiation, Dedifferentiation or Self-Renewal of ES Cells.” *Nature Genetics* 24 (4): 372–76.
- Niwa, Hitoshi, Kazuya Ogawa, Daisuke Shimosato, and Kenjiro Adachi.** 2009. “A Parallel Circuit of LIF Signalling Pathways Maintains Pluripotency of Mouse ES Cells.” *Nature* 460 (7251): 118–22.
- Novelli, Enrico M., Manuel Ramirez, and Curt I. Civin.** 1998. “Biology of CD34+CD38- Cells in Lymphohematopoiesis.” *Leukemia & Lymphoma* 31 (3–4): 285–93.

O-P-Q

- Ogawa, M., P. N. Porter, and T. Nakahata.** 1983. “Renewal and Commitment to Differentiation of Hemopoietic Stem Cells (an Interpretive Review).” *Blood* 61 (5): 823–29.
- Oh, Jong-Hyun, Hyun-Jin Do, Heung-Mo Yang, Shin-Yong Moon, Kwang-Yul Cha, Hyung-Min Chung, and Jae-Hwan Kim.** 2005. “Identification of a Putative Transactivation Domain in Human Nanog.” *Experimental & Molecular Medicine* 37 (3): 250–54.
- Osawa, Masatake, Ken-ichi Hanada, Hirofumi Hamada, and Hiromitsu Nakauchi.** 1996. “Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell.” *Science* 273 (5272): 242–45.
- Oudega, M., E. Marani, and R. T. Thomeer.** 1992. “Transient Expression of Stage-Specific Embryonic Antigen-1 (CD15) in the Developing Dorsal Rat Spinal Cord.” *The Histochemical Journal* 24 (11): 869–77.
- Pan, Guang Jin, Zeng Yi Chang, Hans R. Schöler, and Duanqing Pei.** 2002. “Stem Cell Pluripotency and Transcription Factor Oct4.” *Cell Research* 12 (5): 321–29.

- Papamichos, Spyros I.**, Vassiliki Kotoula, Basil C. Tarlatzis, Theodoros Agorastos, Konstantinos Papazisis, and Alexandros F. Lambropoulos. 2009. "OCT4B1 Isoform: The Novel OCT4 Alternative Spliced Variant as a Putative Marker of Stemness." *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* 15 (5): 269–70.
- Pearce, Daniel J.**, David Taussig, Catherine Simpson, Kirsty Allen, Ama Z. Rohatiner, T. Andrew Lister, and Dominique Bonnet. 2005. "Characterization of Cells with a High Aldehyde Dehydrogenase Activity from Cord Blood and Acute Myeloid Leukemia Samples." *STEM CELLS* 23 (6): 752–60.
- Pelosi, A.**, S. Careccia, V. Lulli, P. Romania, G. Marziali, U. Testa, S. Lavorgna, et al. 2013. "miRNA Let-7c Promotes Granulocytic Differentiation in Acute Myeloid Leukemia." *Oncogene* 32 (31): 3648–54.
- Pera, Edgar M.**, Atsushi Ikeda, Edward Eivers, and Eddy M. De Robertis. 2003. "Integration of IGF, FGF, and Anti-BMP Signals via Smad1 Phosphorylation in Neural Induction." *Genes & Development* 17 (24): 3023–28.
- Pesce, Maurizio**, and Hans R. Schöler. 2001. "Oct-4: Gatekeeper in the Beginnings of Mammalian Development." *STEM CELLS* 19 (4): 271–78. doi:10.1634/stemcells.19-4-271.
- Pigneux A.**, Récher C, Bene MC et al. Addition of Lomustine (CCNU) to Induction and Post-Remission Chemotherapy for Fit Elderly AML Patients without Unfavorable Cytogenetics: Results of the Lamsa-2007 Goelams Trial. *Blood* 2015; American Society of Hematology 126:3736.
- Pittenger, Mark F.**, Alastair M. Mackay, Stephen C. Beck, Rama K. Jaiswal, Robin Douglas, Joseph D. Mosca, Mark A. Moorman, Donald W. Simonetti, Stewart Craig, and Daniel R. Marshak. 1999. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science* 284 (5411): 143–47.
- Prockop, Darwin J.** 1997. "Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues." *Science* 276 (5309): 71–74.
- Prud'homme, Gérald J.** 2012. "Cancer Stem Cells and Novel Targets for Antitumor Strategies." *Current Pharmaceutical Design* 18 (19): 2838–49.

Quesnel B. 2012. Niches Hématopoïétiques et Cellules Souches. *Elsevier Masson*.
<http://www.em-select.com/article/743246>.

R

Rawat, Vijay P. S., Silvia Thoene, Vegi M. Naidu, Natalia Arseni, Bernhard Heilmeier, Klaus Metzeler, Konstantin Petropoulos, et al. 2008. “Overexpression of CDX2 Perturbs *HOX* Gene Expression in Murine Progenitors Depending on Its N-Terminal Domain and Is Closely Correlated with Deregulated *HOX* Gene Expression in Human Acute Myeloid Leukemia.” *Blood* 111 (1): 309–19.

Reubinoff, B. E., M. F. Pera, C. Y. Fong, A. Trounson, and A. Bongso. 2000. “Embryonic Stem Cell Lines from Human Blastocysts: Somatic Differentiation in Vitro.” *Nature Biotechnology* 18 (4): 399–404.

Reya, Tannishtha, Sean J. Morrison, Michael F. Clarke, and Irving L. Weissman. 2001. “Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells.” *Nature* 414 (6859): 105–11.

Ricci, M. Stacey, and Wei-Xing Zong. 2006. “Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways.” *The Oncologist* 11 (4): 342–57. doi:10.1634/theoncologist.11-4-342.

Ricciardi, M. R., T. McQueen, D. Chism, M. Milella, E. Estey, E. Kaldjian, J. Sebolt-Leopold, M. Konopleva, and M. Andreeff. 2005. “Quantitative Single Cell Determination of ERK Phosphorylation and Regulation in Relapsed and Refractory Primary Acute Myeloid Leukemia.” *Leukemia* 19 (9): 1543–49.

Rimmelé, Pauline, Xin Zhang, and Saghi Ghaffari. 2012. “Rôle des facteurs de transcription FoxO dans la maintenance des cellules souches.” *médecine/sciences* 28 (3): 250–54.

Rodda, David J., Joon-Lin Chew, Leng-Hiong Lim, Yui-Han Loh, Bei Wang, Huck-Hui Ng, and Paul Robson. 2005. “Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (26): 24731–37. doi:10.1074/jbc.M502573200.

Rodriguez, Ryan T., J. Matthew Velkey, Carolyn Lutzko, Rina Seerke, Donald B. Kohn, K. Sue O’Shea, and Meri T. Firpo. 2007. “Manipulation of OCT4 Levels in Human Embryonic Stem Cells Results in Induction of Differential Cell Types.” *Experimental Biology and Medicine* 232 (10): 1368–80.

Rosner, Mitchell H., M. Alessandra Vigano, Keiko Ozato, Paula M. Timmons, Francoise Poirie, Peter W. J. Rigby, and Louis M. Staudt. 1990. "A POU-Domain Transcription Factor in Early Stem Cells and Germ Cells of the Mammalian Embryo." *Nature* 345 (6277): 686–92.

S

Sarkar, Abby, and Konrad Hochedlinger. 2013. "The Sox Family of Transcription Factors: Versatile Regulators of Stem and Progenitor Cell Fate." *Cell Stem Cell* 12 (1): 15–30.

Sastry, Lakshmi, Tin Cao, and C. Richter King. 1997. "Multiple Grb2-Protein Complexes in Human Cancer Cells." *International Journal of Cancer* 70 (2): 208–13.

Sato, Noboru, Laurent Meijer, Leandros Skaltsounis, Paul Greengard, and Ali H. Brivanlou. 2004. "Maintenance of Pluripotency in Human and Mouse Embryonic Stem Cells through Activation of Wnt Signaling by a Pharmacological GSK-3-Specific Inhibitor." *Nature Medicine* 10 (1): 55–63.

Schepers, Goslik E., Rohan D. Teasdale, and Peter Koopman. 2002. "Twenty Pairs of Sox." *Developmental Cell* 3 (2): 167–70.

Schessl, Christina, Vijay P. S. Rawat, Monica Cusan, Aniruddha Deshpande, Tobias M. Kohl, Patricia M. Rosten, Karsten Spiekermann, et al. 2005. "The *AML1-ETO* Fusion Gene and the *FLT3* Length Mutation Collaborate in Inducing Acute Leukemia in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 115 (8): 2159–68.

Schmelzle, Tobias, and Michael N Hall. 2000. "TOR, a Central Controller of Cell Growth." *Cell* 103 (2): 253–62.

Schoenhals, Matthieu, Alboukadel Kassambara, John De Vos, Dirk Hose, Jérôme Moreaux, and Bernard Klein. 2009. "Embryonic Stem Cell Markers Expression in Cancers." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383 (2): 157–62.

Schofield, R. 1978. "The Relationship between the Spleen Colony-Forming Cell and the Haemopoietic Stem Cell." *Blood Cells* 4 (1–2): 7–25.

- Schöler, H R**, G R Dressler, R Balling, H Rohdewohld, and P Gruss. 1990. "Oct-4: A Germline-Specific Transcription Factor Mapping to the Mouse T-Complex." *The EMBO Journal* 9 (7): 2185–95.
- Scholl, Claudia**, Dimple Bansal, Konstanze Döhner, Karina Eiwen, Brian J.P. Huntly, Benjamin H. Lee, Frank G. Rücker, et al. 2007. "The Homeobox Gene CDX2 Is Aberrantly Expressed in Most Cases of Acute Myeloid Leukemia and Promotes Leukemogenesis." *Journal of Clinical Investigation* 117 (4): 1037–48.
- Sharma, Shilpa**, Gangenahalli U. Gurudutta, Neeraj Kumar Satija, Soumya Pati, Farhat Afrin, Pallavi Gupta, Yogesh Kumar Verma, Vimal Kishor Singh, and R.p. Tripathi. 2006. "Stem Cell c-KIT and HOXB4 Genes: Critical Roles and Mechanisms in Self-Renewal, Proliferation, and Differentiation." *Stem Cells and Development* 15 (6): 755–78.
- Sharov, Alexei A**, Shinji Masui, Lioudmila V Sharova, Yulan Piao, Kazuhiro Aiba, Ryo Matoba, Li Xin, Hitoshi Niwa, and Minoru SH Ko. 2008. "Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog Downstream Target Genes with Statistical Confidence by Applying a Novel Algorithm to Time Course Microarray and Genome-Wide Chromatin Immunoprecipitation Data." *BMC Genomics* 9 (June): 269.
- Shevinsky, Lynne Hamburger**, Barbara B. Knowles, Ivan Damjanov, and Davor Solter. 1982. "Monoclonal Antibody to Murine Embryos Defines a Stage-Specific Embryonic Antigen Expressed on Mouse Embryos and Human Teratocarcinoma Cells." *Cell* 30 (3): 697–705.
- Shin, D.-M.**, R. Liu, I. Klich, W. Wu, J. Ratajczak, M. Kucia, and M. Z. Ratajczak. 2010. "Molecular Signature of Adult Bone Marrow-Purified Very Small Embryonic-like Stem Cells Supports Their Developmental Epiblast/germ Line Origin." *Leukemia* 24 (8): 1450–61.
- Shin, Dong-Myung**, Ewa K. Zuba-Surma, Wan Wu, Janina Ratajczak, Marcin Wysoczynski, Mariusz Z. Ratajczak, and Magda Kucia. 2009. "Novel Epigenetic Mechanisms That Control Pluripotency and Quiescence of Adult Bone Marrow-Derived Oct4+ Very Small Embryonic Like Stem Cells." *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 23 (11): 2042–51.
- Shultz, Leonard D.**, Fumihiko Ishikawa, and Dale L. Greiner. 2007. "Humanized Mice in Translational Biomedical Research." *Nature Reviews Immunology* 7 (2): 118–30.

- Silva Meirelles**, Lindolfo da, Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas, and Arnold I. Caplan. 2009. "Mechanisms Involved in the Therapeutic Properties of Mesenchymal Stem Cells." *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Bone Morphogenetic Proteins, Stem Cells and Regenerative Medicine, 20 (5): 419–27.
- Sinclair, Andrew H.**, Philippe Berta, Mark S. Palmer, J. Ross Hawkins, Beatrice L. Griffiths, Matthijs J. Smith, Jamie W. Foster, Anna-Maria Frischauf, Robin Lovell-Badge, and Peter N. Goodfellow. 1990. "A Gene from the Human Sex-Determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-Binding Motif." *Nature* 346 (6281): 240–44.
- Singh, Harinder.** 1996. "Gene Targeting Reveals a Hierarchy of Transcription Factors Regulating Specification of Lymphoid Cell Fates." *Current Opinion in Immunology* 8 (2): 160–65.
- Singh, Sanjay K.**, Mohamedi N. Kagalwala, Jan Parker-Thornburg, Henry Adams, and Sadhan Majumder. 2008. "REST/NRSF Maintains Self-Renewal and Pluripotency of Embryonic Stem Cells." *Nature* 453 (7192): 223–27.
- Siu, Michelle K.Y.**, Esther S.Y. Wong, Hoi Yan Chan, Hextan Y.S. Ngan, Kelvin Y.K. Chan, and Annie N.Y. Cheung. 2008. "Overexpression of NANOG in Gestational Trophoblastic Diseases." *The American Journal of Pathology* 173 (4): 1165–72.
- Sliwa, Thamer**, Sally Awsa, Michael Vesely, Doris Rokitte, Peter Grossschmidt, Ruth Jilch, Walter Ulrich, and Klaus Geissler. 2014. "Hyperexpression of NOTCH-1 Is Found in Immature Acute Myeloid Leukemia." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7 (3): 882–89.
- Solchaga**, Luis A., Kitsie Penick, Victor M. Goldberg, Arnold I. Caplan, and Jean F. Welter. 2010. "Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Proliferation and Delays Loss of Chondrogenic Potential in Human Adult Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Tissue Engineering. Part A* 16 (3): 1009–19.
- Solter, D.**, and B B Knowles. 1978. "Monoclonal Antibody Defining a Stage-Specific Mouse Embryonic Antigen (SSEA-1)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (11): 5565–69.

- Solter, Davor**, Lynne Shevinsky, Barbara B. Knowles, and Sidney Strickland. 1979. "The Induction of Antigenic Changes in a Teratocarcinoma Stem Cell Line (F9) by Retinoic Acid." *Developmental Biology* 70 (2): 515–21.
- Son, Myung Jin**, Kevin Woolard, Do-Hyun Nam, Jeongwu Lee, and Howard A. Fine. 2009. "SSEA-1 Is an Enrichment Marker for Tumor-Initiating Cells in Human Glioblastoma." *Cell Stem Cell* 4 (5): 440–52.
- Spangrude, G. J.**, and D. M. Brooks. 1992. "Phenotypic Analysis of Mouse Hematopoietic Stem Cells Shows a Thy-1- Negative Subset." *Blood* 80 (8): 1957–64.
- Steensma, D. P.**, R. F. McClure, J. E. Karp, A. Tefferi, T. L. Lasho, H. L. Powell, G. W. DeWald, and S. H. Kaufmann. 2006. "JAK2 V617F Is a Rare Finding in de Novo Acute Myeloid Leukemia, but STAT3 Activation Is Common and Remains Unexplained." *Leukemia* 20 (6): 971–78.
- Stefanovic, Sonia**, Nesrine Abboud, Stéphanie Désilets, David Nury, Chad Cowan, and Michel Pucéat. 2009. "Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: A Molecular Switch from Stem Cell Pluripotency to Specifying a Cardiac Fate." *The Journal of Cell Biology* 186 (5): 665–73.
- Stock W**, Thirman MJ. 2017. Pathogenesis of acute myeloid leukemia. *UpDate*.
<http://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-acute-myeloid-leukemia>.
- Storm, Mike P.**, Heather K. Bone, Craig G. Beck, Pierre-Yves Bourillot, Valerie Schreiber, Teresa Damiano, Adam Nelson, Pierre Savatier, and Melanie J. Welham. 2007. "Regulation of Nanog Expression by Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Signaling in Murine Embryonic Stem Cells." *Journal of Biological Chemistry* 282 (9): 6265–73.
- Strelchenko, Nick**, Oleg Verlinsky, Valeri Kukharenko, and Yury Verlinsky. 2004. "Morula-Derived Human Embryonic Stem Cells." *Reproductive Biomedicine Online* 9 (6): 623–29.
- Suzuki, Yozo**, Naotsugu Haraguchi, Hidekazu Takahashi, Mamoru Uemura, Junichi Nishimura, Taishi Hata, Ichiro Takemasa, et al. 2013. "SSEA-3 as a Novel Amplifying Cancer Cell Surface Marker in Colorectal Cancers." *International Journal of Oncology* 42 (1): 161–67.

T

- Tajima, Fumihito**, Takao Deguchi, Joseph H. Laver, Haiqun Zeng, and Makio Ogawa. 2001. “Reciprocal Expression of CD38 and CD34 by Adult Murine Hematopoietic Stem Cells.” *Blood* 97 (9): 2618–24.
- Takahashi, Kazutoshi**, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. 2007. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors.” *Cell* 131 (5): 861–72.
- Takahashi, Kazutoshi**, and Shinya Yamanaka. 2006. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.” *Cell* 126 (4): 663–76.
- Tamburini, Jerome**, Caroline Elie, Valérie Bardet, Nicolas Chapuis, Sophie Park, Philippe Broët, Pascale Cornillet-Lefebvre, et al. 2007. “Constitutive Phosphoinositide 3-kinase/Akt Activation Represents a Favorable Prognostic Factor in de Novo Acute Myelogenous Leukemia Patients.” *Blood* 110 (3): 1025–28.
- Terwijn, Monique**, Wendelien Zeijlemaker, Angèle Kelder, Arjo P. Rutten, Alexander N. Snel, Willemijn J. Scholten, Thomas Pabst, et al. 2014. “Leukemic Stem Cell Frequency: A Strong Biomarker for Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia.” *PloS One* 9 (9): e107587.
- Thomson, James A.**, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, and Jeffrey M. Jones. 1998. “Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts.” *Science* 282 (5391): 1145–47.
- Till, J. E.**, and E. A. McCulloch. 2010. “A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells.” *Radiation Research* 175 (2): 145–49.
- Tilly, H**, S Castaigne, D Bordessoule, P Casassus, P Y Le Prisé, G Tertian, B Desablens, M Henry-Amar, and L Degos. 1990. “Low-Dose Cytarabine versus Intensive Chemotherapy in the Treatment of Acute Nonlymphocytic Leukemia in the Elderly.” *Journal of Clinical Oncology* 8 (2): 272–79.
- Tiscornia, Gustavo**, and Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2010. “MicroRNAs in Embryonic Stem Cell Function and Fate.” *Genes & Development* 24 (24): 2732–41.

Tohda, Shuji. 2014. “NOTCH Signaling Roles in Acute Myeloid Leukemia Cell Growth and Interaction with Other Stemness-Related Signals.” *Anticancer Research* 34 (11): 6259–64.

Tondeur, S., S. Assou, L. Nadal, S. Hamamah, and J. De Vos. 2008. “Biologie et Potentialités Des Cellules Souches Embryonnaires Humaines.” *Annales de Biologie Clinique* 66 (3): 241–47.

V-W

Vardiman, James W., J. Thiele, Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., Harris N.L. et al. 2009. "The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes". *Blood* 114: 937-951.

Visvanathan, Jaya, Seunghye Lee, Bora Lee, Jae W. Lee, and Soo-Kyung Lee. 2007. “The microRNA miR-124 Antagonizes the Anti-Neural REST/SCP1 Pathway during Embryonic CNS Development.” *Genes & Development* 21 (7): 744–49.

Wang, Qi, Wei He, Changdong Lu, Zhong Wang, Junsheng Wang, Karl Erik Giercksky, Jahn M. Nesland, and Zhenhe Suo. 2009. “Oct3/4 and Sox2 Are Significantly Associated with an Unfavorable Clinical Outcome in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma.” *Anticancer Research* 29 (4): 1233–41.

Watanabe, S., H. Umehara, K. Murayama, M. Okabe, T. Kimura, and T. Nakano. 2006. “Activation of Akt Signaling Is Sufficient to Maintain Pluripotency in Mouse and Primate Embryonic Stem Cells.” *Oncogene* 25 (19): 2697–2707.

Wegner, Michael. 2010. “All Purpose Sox: The Many Roles of Sox Proteins in Gene Expression.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, SOX Transcription Factors, 42 (3): 381–90.

Weissman, Irving L., and Judith A. Shizuru. 2008. “The Origins of the Identification and Isolation of Hematopoietic Stem Cells, and Their Capability to Induce Donor-Specific Transplantation Tolerance and Treat Autoimmune Diseases.” *Blood* 112 (9): 3543–53.

Weng, Andrew P, and Jon C Aster. 2004. “Multiple Niches for Notch in Cancer: Context Is Everything.” *Current Opinion in Genetics & Development* 14 (1): 48–54.

- Werbowski-Ogilvie, Tamra E.**, Marc Bossé, Morag Stewart, Angelique Schnerch, Veronica Ramos-Mejia, Anne Rouleau, Tracy Wynder, et al. 2009. "Characterization of Human Embryonic Stem Cells with Features of Neoplastic Progression." *Nature Biotechnology* 27 (1): 91–97.
- Willems L**, Bouscary D. La transduction du signal : Voies de signalisation oncogéniques accessibles aux thérapies ciblées en oncologie. 2011. *Edimark*.
[http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/18041 IV\(n°4\):168-83](http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/18041 IV(n°4):168-83).
- Wiles, M. V.**, and G. Keller. 1991. "Multiple Hematopoietic Lineages Develop from Embryonic Stem (ES) Cells in Culture." *Development* 111 (2): 259–67.
- Wilson, Anne**, and Andreas Trumpp. 2006. "Bone-Marrow Haematopoietic-Stem-Cell Niches." *Nature Reviews Immunology* 6 (2): 93–106.
- Wobus, A. M.**, G. Wallukat, and J. Hescheler. 1991. "Pluripotent Mouse Embryonic Stem Cells Are Able to Differentiate into Cardiomyocytes Expressing Chronotropic Responses to Adrenergic and Cholinergic Agents and Ca²⁺ Channel Blockers." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 48 (3): 173–82.
- Wright, Andrew J.**, and Peter W. Andrews. 2009. "Surface Marker Antigens in the Characterization of Human Embryonic Stem Cells." *Stem Cell Research* 3 (1): 3–11.
- Wu, A. M.**, J. E. Till, L. Siminovitch, and E. A. McCulloch. 1967. "A Cytological Study of the Capacity for Differentiation of Normal Hemopoietic Colony-Forming Cells." *Journal of Cellular Physiology* 69 (2): 177–84.
- Wu, Wen-Rui**, Wen-Rui Wu, Rui Zhang, Rui Zhang, Xiang-De Shi, Xiang-De Shi, Cao Yi, et al. 2016. "Notch2 Is a Crucial Regulator of Self-Renewal and Tumorigenicity in Human Hepatocellular Carcinoma Cells." *Oncology Reports* 36 (1): 181–88.

X-Y-Z

- Xu, Feng**, Chaoliu Dai, Rui Zhang, Yang Zhao, Songlin Peng, and Changjun Jia. 2012. "Nanog: A Potential Biomarker for Liver Metastasis of Colorectal Cancer." *Digestive Diseases and Sciences* 57 (9): 2340–46.

- Xu, Xia**, Rishi Rampersad, Brigid L. M. Hogan, and Mark W. Onaitis. 2016. “Mechanism of Notch and Sox2 in Kras Driven Lung Adenocarcinoma in Type II Cells*.” *Journal of Thoracic Oncology* 11 (2): S54.
- Yahata, Takashi**, Yukari Muguruma, Shizu Yumino, Yin Sheng, Tomoko Uno, Hideyuki Matsuzawa, Mamoru Ito, Shunichi Kato, Tomomitsu Hotta, and Kiyoshi Ando. 2008. “Quiescent Human Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow Niches Organize the Hierarchical Structure of Hematopoiesis.” *STEM CELLS* 26 (12): 3228–36.
- Yang, Z.-Z.**, O. Tschopp, A. Baudry, B. Dümmler, D. Hynx, and B. A. Hemmings. 2004. “Physiological Functions of Protein Kinase B/Akt.” *Biochemical Society Transactions* 32 (2): 350–54.
- Yasuda, Hiromi**, Koji Tanaka, Yoshiki Okita, Toshimitsu Araki, Susumu Saigusa, Yuji Toiyama, Takeshi Yokoe, et al. 2011. “CD133, OCT4, and NANOG in Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer.” *Oncology Letters* 2 (6): 1065–71.
- Yin, Jia-Yu**, Qin Tang, Ling-ling Zhai, Ling-yu Zhou, Jun Qian, Jiang Lin, Xiang-mei Wen, et al. 2015. “High Expression of OCT4 Is Frequent and May Cause Undesirable Treatment Outcomes in Patients with Acute Myeloid Leukemia.” *Tumor Biology* 36 (12): 9711–16.
- Yu, Zipu**, Yu Zou, Jingya Fan, Chengchen Li, and Liang Ma. 2016. “Notch1 Is Associated with the Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to Cardiomyocytes.” *Molecular Medicine Reports* 14 (6): 5065–71.
- Zavidij, Oksana**, Claudia R. Ball, Friederike Herbst, Sylvia Fessler, Manfred Schmidt, Christof von Kalle, and Hanno Glimm. 2010. “Hematopoietic Activity of Human Short-Term Repopulating Cells in Mobilized Peripheral Blood Cell Transplants Is Restricted to the First 5 Months after Transplantation.” *Blood* 115 (24): 5023–25.
- Zeijlemaker, W.**, A. Kelder, Y. J. M. Oussoren-Brockhoff, W. J. Scholten, A. N. Snel, D. Veldhuizen, J. Cloos, G. J. Ossenkoppele, and G. J. Schuurhuis. 2016. “A Simple One-Tube Assay for Immunophenotypical Quantification of Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia.” *Leukemia* 30 (2): 439–46.
- Zhang, Yi**, Zhi Wang, Jin Yu, Jia zhong Shi, Chun Wang, Wei hua Fu, Zhi wen Chen, and Jin Yang. 2012. “Cancer Stem-like Cells Contribute to Cisplatin Resistance and Progression in Bladder Cancer.” *Cancer Letters* 322 (1): 70–77.

Zhong, R. K., C. M. Astle, and D. E. Harrison. 1996. "Distinct Developmental Patterns of Short-Term and Long-Term Functioning Lymphoid and Myeloid Precursors Defined by Competitive Limiting Dilution Analysis in Vivo." *The Journal of Immunology* 157 (1): 138–45.

Zwaka, Thomas P., and James A. Thomson. 2005. "Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Occurs through Symmetric Cell Division." *STEM CELLS* 23 (2): 146–49.

Les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) représentent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes, caractérisées par une accumulation de progéniteurs myéloïdes indifférenciés. Cette accumulation proviendrait de l'existence de cellules souches leucémiques responsables de la résistance aux traitements et de la rechute de la maladie. Les Cellules Souches Leucémiques (CSL) se comportent comme les cellules souches embryonnaires, lesquelles expriment des marqueurs embryonnaires leur procurant des capacités de prolifération, d'autorenouvellement et d'absence de différenciation. Plusieurs études ont démontré le rôle des facteurs de transcription embryonnaires composant le réseau cœur de la pluripotence (OCT4, NANOG, et SOX2) et de marqueurs membranaires (SSEA1 et SSEA3) dans la cancérogénèse, mais peu de données concernent les LAM. Dans le but d'identifier le rôle fonctionnel des marqueurs embryonnaires dans la LAM, une évaluation de leur expression dans les compartiments CD34⁺ de cellules hématopoïétiques et leucémiques a été réalisée. Leur sur-expression et leur implication dans les propriétés des cellules leucémiques, nous laisse penser que ces antigènes embryonnaires (notamment OCT4), peuvent être utilisés comme marqueurs discriminants de la maladie résiduelle mais aussi comme cible thérapeutique potentielle. Cependant, les mécanismes de Leucémogénèse par lesquels les antigènes embryonnaires seraient impliqués restent encore à être élucidés.

Mots clés : Leucémie Aiguë Myéloïde, Cellule Souche Leucémique, marqueurs embryonnaires, maladie résiduelle, différenciation, prolifération, cible thérapeutique.

Acute Myeloid Leukemias (AMLs) represent a heterogeneous group of malignant haemopathies, characterized by an accumulation of undifferentiated myeloid progenitors. This accumulation comes from the presence of Leukemic Stem Cells (LSCs) responsible for the resistance to treatment and relapse of the disease. LSCs behave as embryonic stem cells, which express embryonic markers giving them proliferation, self-renewal and lack of differentiation. Several studies have demonstrated the role of embryonic transcription factors composing the core network of pluripotency (OCT4, NANOG and SOX2) and membrane markers (SSEA1 and SSEA3) in carcinogenesis, but there is few data in AML. In order to identify the functional role of the embryonic markers in AML, an evaluation of their expression in haematopoietic and leukemic cells CD34⁺ compartments was carried out. Their overexpression and involvement in the properties of leukemic cells, suggest that these embryonic antigens (especially OCT4), can be used as discriminating markers of residual disease as well as a potential therapeutic target. However, the mechanisms of leukemogenesis by which embryonic antigens are involved remain to be elucidated.

Keywords: Acute Myeloid Leukemia, Leukemic Stem Cells, embryonic markers, residual disease, differentiation, proliferation, therapeutic target.