



HAL
open science

Microenvironnement médullaire et résistance des LAM FLT3-ITD aux inhibiteurs de tyrosine kinase : Rôle pivot du récepteur TAM AXL

Pierre-Yves Dumas

► **To cite this version:**

Pierre-Yves Dumas. Microenvironnement médullaire et résistance des LAM FLT3-ITD aux inhibiteurs de tyrosine kinase : Rôle pivot du récepteur TAM AXL. Cancer. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0675 . tel-01823822

HAL Id: tel-01823822

<https://theses.hal.science/tel-01823822v1>

Submitted on 26 Jun 2018

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
en vue de l'obtention du

DOCTORAT

de Biologie Cellulaire et Physiopathologie

délivré par L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ÉCOLE DOCTORALE des SCIENCES de la VIE et de la SANTE

Présentée et soutenue publiquement
le 10 Octobre 2017, par

Pierre-Yves DUMAS

Né le 08 juillet 1981 à Toulouse

**Microenvironnement médullaire et résistance des LAM FLT3-ITD
aux inhibiteurs de tyrosine kinase
Rôle pivot du récepteur TAM AXL**

Sous la direction du Docteur Jean-Max PASQUET

Membres du jury

Monsieur le Professeur Noël MILPIED	Président
Madame le Docteur Fabienne MEGGETTO	Rapporteur
Monsieur le Professeur Eric SOLARY	Rapporteur
Monsieur le Professeur Christian RECHER	Examineur
Monsieur le Professeur Arnaud PIGNEUX	Examineur
Monsieur le Professeur Philippe ROUSSELOT	Invité
Monsieur le Docteur Jean-Max PASQUET	Directeur

À Elodie,

Merci pour ton soutien de chaque jour et ta patience, ce travail est là grâce à toi,

À Antoine et Oscar,

Merci pour votre capacité surnaturelle à me changer les idées,

À mes parents,

À Marion et Paul,

Merci pour votre soutien depuis ces nombreuses années,

À Catherine et Alain,

Remerciements,

Aux membres du jury,

Professeur Noël Milpied

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie de la disponibilité dont vous avez toujours fait preuve à mon égard et de votre soutien depuis maintenant 10 ans. Veuillez trouver ici l'assurance de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Docteur Fabienne Meggetto

Vous avez accepté d'assurer la charge d'être rapporteur de ce travail et de faire partie de ce jury et je vous en remercie. J'ose espérer que l'avancement des travaux depuis votre participation à mon jury de mi-thèse vous aura convaincue.

Professeur Eric Solary

Vous avez accepté d'assurer la charge d'être rapporteur de ce travail et de faire partie de ce jury et je vous en remercie. J'espère que ce manuscrit de thèse sera au niveau de vos attentes.

Professeur Christian Récher

Tu as accepté de faire partie de ce jury et je t'en remercie. Tes enseignements, au lit du malade pendant quelques mois, mais surtout au cours de fréquentes discussions ne sont pas étrangers à mon implication dans la recherche autour des leucémies aiguës. J'espère que ce travail sera au niveau de tes attentes.

Professeur Arnaud Pigneux

Tu as accepté de faire partie de ce jury et je t'en remercie. Ton soutien de tous les jours dans ce parcours me permet de l'aborder avec assurance. Je reste honoré de la confiance que tu m'accordes continuellement et espère pouvoir continuer à construire des projets autour des leucémies aiguës à tes côtés.

Professeur Philippe Rousselot

Vous avez accepté de faire partie de ce jury et je vous en remercie. J'espère que ce manuscrit de thèse sera au niveau de vos attentes.

À mon directeur de thèse,

Docteur Jean-Max Pasquet

Je te remercie tout particulièrement de m'avoir dirigé et encouragé dans ce travail. A cette occasion, je t'exprime toute ma reconnaissance et mon respect pour ton soutien et ta volonté d'avancer. Je te remercie aussi de m'avoir laissé explorer, au sein de l'équipe, des thématiques parallèles à notre travail principal.

À l'unité INSERM U1035, ce laboratoire m'a permis de découvrir la recherche fondamentale puis de poursuivre mes propres projets. Merci aux Pr. Alain Taieb et Pr. Hubert de Verneuil.

Un grand merci à l'équipe CSHNL de m'avoir encadré dans ce travail : Isabelle, Vanessa, Arnaud, Amélie et le Pr. Praloran. À Eric pour mon initiation à la recherche. À l'équipe de l'EFS, Zoran, Xavier et Philippe. À l'équipe de Biothérapie : François, Aurélie, Sandrine et les deux Isabelle, à la plateforme de Vectorologie, et aux équipes d'immuno-dermatologie et dermatologie, à Isabelle, Katia et Audrey.

Merci à Claire qui a beaucoup œuvré sur l'anticorps anti-AXL pendant son Master 2, et à Melody qui non seulement assure son travail sur mon récepteur NK fétiche mais qui a aussi grandement participé aux expérimentations animales.

À l'unité INSERM U1016 de l'Institut Cochin, Isabelle Dusanter-Fourt et Cécile Naudin pour leur implication dans ce projet ; Evelyne Lauret et Didier Bouscary pour leur relecture du manuscrit.

À Benoît et Julien du Service Commun des Animaleries de Bordeaux pour leur implication sans faille. À Alban, Nathalie et au Pr. Dubus de la plateforme d'Histologie.

À l'unité CNRS UMR5164, Patrick Blanco, Isabelle Pellegrin, Vincent Pitard. Un grand merci à Julie Déchanet-Merville sans qui je n'aurai probablement pas pu partir en post-doctorat dans le laboratoire du Pr. E. Vivier.

À l'équipe ACTION et ses ActionMAN, Florence, Mathieu, Béatrice, Bruno et les Valérie. Merci au Pr. FX Mahon pour son soutien depuis de nombreuses années. À Olivier et Stéphane, notre « open-space » à 4 dans 4 m² ne fut pas si désagréable que ça.

À l'équipe du service d'Hématologie : Thibaut, Marie-Sarah, Krime, Reza, Cyrille, Laurence, Pr. Marit, Sophie et Axelle. À mes anciens co-internes et mes anciens internes. À Edouard, mon comparse américain, qui répond toujours présent.

À l'équipe du laboratoire d'Hématologie : Chloé, Emilie, Nicolas, Francis et Jean-Philippe. À Audrey et Marina, c'est un plaisir de travailler avec vous.

Aux amis qui m'accompagnent depuis toutes ces années.

Microenvironnement médullaire et résistance des LAM FLT3-ITD aux inhibiteurs de tyrosine kinase : Rôle pivot du récepteur TAM AXL

La duplication interne en tandem au sein du gène du *Fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3) est l'une des mutations les plus fréquemment observées dans les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM). Elle est corrélée à un mauvais pronostic. Des inhibiteurs de tyrosine kinase anti-FLT3 (FLT3-ITK) sont en cours de développement mais les premiers essais cliniques ont été décevants. Les rémissions sont de courte durée, et si une clairance leucémique sanguine est observée, la LAM persiste au sein de la moelle osseuse. Dans ce travail, nous avons démontré que les cytokines activatrices de STAT5, telles que l'interleukine-3 et la thrombopoïétine, et les basses pressions en oxygène, telles que celles observées au sein de la niche hématopoïétique augmentent l'expression et l'activité du récepteur tyrosine kinase AXL qui protège les cellules de LAM FLT3-ITD de l'apoptose induite par le FLT3-ITK quizartinib (AC220). Nous avons démontré dans un modèle murin que les cellules de LAM FLT3-ITD « knock-down » pour AXL sont plus sensibles au quizartinib, et que cette différence se révèle spécifiquement dans un modèle de prise de greffe hématopoïétique. La combinaison de stratégies inhibitrices du FLT3-ITD et d'AXL permettra d'améliorer l'efficacité des FLT3-ITK en atteignant la fraction de cellules responsable des rechutes, nichée dans son microenvironnement. A l'issue, nous avons démontré que le gilteritinib (ASP2215), double FLT3/AXL-ITK est plus efficace que le quizartinib pour atteindre ces cellules leucémiques médullaires. Enfin, nous avons démontré que la combinaison d'un anticorps monoclonal anti-AXL avec un FLT3-ITK ou de la cytarabine était une stratégie thérapeutique prometteuse dans les LAM FLT3-ITD ou sauvage.

Mots clés : Leucémie aiguë myéloblastique, FLT3-ITD, AXL, microenvironnement, hypoxie, cytokines, STAT5

Unité de recherche

INSERM U1035,

146 rue Léo Saignat, Bâtiment TP Zone Sud, 4^{ème} étage, 33076 Bordeaux Cedex

Microenvironment favors FLT3-ITD AML resistance to FLT3-TKI through hypoxia- and STAT5- dependent upregulation of AXL

Internal tandem duplication in *Fms-like tyrosine kinase 3* gene (FLT3-ITD) is the most frequent mutation observed in acute myeloid leukemia (AML), and correlates with poor prognosis. FLT3 tyrosine kinase inhibitors (FLT3-TKI) have been promising for therapeutic strategies but clinical trials have revealed rarely long-lasting remission with persistent leukemic cells present in the bone marrow. In this work, we show that the hematopoietic niche microenvironment protects FLT3-ITD AML cells from FLT3-TKI quizartinib (AC220) through convergent up-regulation of AXL expression and activity. Cytokine-dependent activation of STAT5 enhances AXL gene transcription and expression, while low O₂ concentration up-regulates AXL protein levels. Moreover, cytokines such as thrombopoietin or interleukin-3 directly activate AXL. RNA interference-based inhibition of AXL expression in FLT3-ITD AML cells allowed a selective purge of leukemic cells within their microenvironment when combined with FLT3-TKI in immuno-compromised mice. Altogether, our data support a strategy combining FLT3-TKI and anti-AXL therapy to eradicate FLT3-ITD AML cells, including those protected by the hematopoietic niche. In such a setting, we performed a study to test the efficacy of gilteritinib (ASP2215) and we showed *in vitro* and *in vivo* that this dual FLT3/AXL-TKI is more efficient to eradicate leukemic cells in their microenvironment than quizartinib which is a more specific FLT3-TKI. Finally, we also studied an anti-AXL monoclonal antibody on primary AML cells and showed that its efficacy could be interesting with FLT3-TKI and cytarabine in both FLT3-wild type and FLT3-ITD AML.

Keywords : Acute myeloid leukemia, FLT3-ITD, AXL, microenvironment, hypoxia, cytokines, STAT5

Unité de recherche

INSERM U1035,

146 rue Léo Saignat, Bâtiment TP Zone Sud, 4^{ème} étage, 33076 Bordeaux Cedex

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Stratification du risque pronostique selon la classification ELN 2017, d'après Döhner *et al.*, *Blood* 2017.⁴..... 20

Tableau 2 : Catégories fonctionnelles des mutations classiquement retrouvées dans les LAM, d'après Bullinger *et al.*, *JCO* 2017.⁴⁶..... 27

Tableau 3 : Prévalence des mutations du FLT3 dans de grandes cohortes de patients atteints de LAM..... 28

Tableau 4 : Différents types d'inhibiteurs de tyrosine kinase utilisés dans les LAM FLT3-ITD, leurs cibles et les mutations de résistance 57

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Modèles d'évolutions clonales de LAM en rechute, d'après Ding <i>et al.</i> , <i>Nature</i> 2012. ¹⁰³	38
Figure 2 : Modèle d'évolution clonale : du SMD à la LAM secondaire, d'après Walter <i>et al.</i> , <i>N Engl J Med</i> 2012. ¹⁰⁴	39
Figure 3 : Modèles de rechutes en présence d'une hématopoïèse clonale, d'après Jan <i>et al.</i> , <i>Oncogene</i> 2013. ¹⁰⁵	40
Figure 4 : Modèles d'acquisition de mutations avant d'aboutir à un phénotype de LAM, d'après Hirsch <i>et al.</i> , <i>Nat Comm</i> 2016. ¹⁰⁷	41
Figure 5 : Représentation schématique du récepteur FLT3 et localisation des ITD, d'après Kayser <i>et al.</i> <i>Blood</i> 2009. ¹¹⁵	44
Figure 6 : Représentation schématique et simplifiée des voies de transduction du signal en aval du FLT3, à l'issue de la fixation de son ligand, d'après Stirewalt & Radich, <i>Nat. Rev. Cancer</i> 2003. ¹¹⁸	45
Figure 7 : Signalisation entraînant une activation de STAT5 dans l'hématopoïèse normale et leucémique, d'après Schepers <i>et al.</i> <i>JAK-STAT</i> 2012. ¹³³	49
Figure 8 : Dendrogrammes des protéines kinases humaines avec localisation d'AXL, de FLT3, et niveau de spécificité des FLT3-ITK, d'après Zarrinkar <i>et al.</i> <i>Blood</i> 2009, ²⁰¹ et Karaman <i>et al.</i> <i>Nature Biotech</i> 2008. ¹⁸⁴	63
Figure 9 : Classification des mécanismes de résistance aux FLT3-ITK, intrinsèques ou extrinsèques à la cellule.	64

Figure 10 : Modèle d'évolution clonale de blastes LAM FLT3-ITD et FLT3-WT après chimiothérapie conventionnelle puis après traitement par FLT3-ITK, exemple du quizartinib, d'après Smith *et al.*, *Blood* 2017.²¹⁹ 67

Figure 11 : Représentation schématique de la niche hématopoïétique adulte d'après Crane & Morisson, *Nat Rev Immunology* 2017.²³⁴ 71

Figure 12 : Activation des RTAM par les ligands GAS6 et PROS1, d'après Lew *et al.* *eLife* 2014.³⁴¹ 88

Figure 13 : Signalisation en aval de l'activation d'AXL, d'après Linger *et al.*, *Adv Cancer Research* 2008.³³⁶ 92

Figure 14 : Représentation schématique des principaux messages issus des travaux de ce doctorat. 182

LISTE DES ABREVIATIONS

ASH	<i>American Society of Hematology</i>
CBF	« Core-binding factor »
CHIP	« Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential »
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CSM	Cellule Stromale Mésoenchymateuse
ECD	« Extra Cellular Domain »
ELN	<i>European Leukemia Net</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
GAL	Galectine
ITD	« Internal Tandem Duplication »
ITK	Inhibiteur de Tyrosine Kinase
JMD	« Juxta Membrane Domain »
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LAM	Leucémie Aiguë Myéloblastique
LIC	« Leukemic Initiating Cell »
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
NK	Lymphocyte Natural Killer
Phi	Chromosome Philadelphie
PtdSer	Phosphatidyl Serine
RC	Rémission Complète
RTAM	Récepteur TAM
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
SMD	Syndrome Myélodysplasique
SMP	Syndrome Myéloprolifératif
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TK	Tyrosine Kinase
TKD	« Tyrosine Kinase Domain »
TMD	« Trans Membrane Domain »
LOH	« Loss of Heterozygosity »
WT	« Wild Type »

Quelques termes anglosaxons ont été conservés pour améliorer la fluidité de lecture. Ils seront utilisés entre guillemets :

Driver	Mutation impliquant un lien de causalité direct avec l'oncogenèse
Passenger	Mutation n'impliquant pas de causalité directe avec l'oncogenèse
Immunoediting	Effets de l'immunité sur le cancer et du cancer sur l'immunité
Knock-down	Diminution de l'expression d'un gène
Knock-out	Invalidation génétique totale
Knock-in	Introduction d'un gène dans un locus spécifique
Stemness	Potentiel souche, le terme de « souchitude » a été proposé
Activation-loop	Se rapporte aux mutations dans la boucle d'activation des RTK
Gatekeeper	Se rapporte aux mutations au niveau du site de fixation d'un ITK
Docking site	Site d'ancrage pour d'autres protéines
Off-target	Se rapporte à un effet indépendant de la cible principale
On-target	Se rapporte à un effet dépendant de la cible principale
Single Cell Analysis	Techniques de transcriptomique à l'échelle unicellulaire
Homing	Phénomène d'écotaxie pour un territoire particulier
Bypass signaling	Mécanisme de maintien d'une signalisation parallèle

PLAN

INTRODUCTION.....	17
I. Les Leucémies Aiguës Myéloblastiques.....	17
A. Généralités.....	17
1. Aspects épidémiologiques.....	17
2. Aspects diagnostiques.....	18
3. Aspects thérapeutiques.....	18
B. Classifications des LAM.....	25
1. Caractérisation cytologique.....	25
2. Caractérisation cytogénétique.....	25
3. Caractérisation moléculaire.....	26
C. Phylogénie des LAM.....	32
1. Cellule souche cancéreuse.....	32
2. Hématopoïèse pré-leucémique.....	33
3. Evolution clonale.....	36
D. Le récepteur tyrosine kinase Fms-like tyrosine kinase 3.....	43
1. Rôle du FLT3 dans l'hématopoïèse normale.....	43
2. Rôle du FLT3 dans les LAM.....	47
3. Inhibiteurs de tyrosine kinase dans les LAM FLT3 mutées.....	54
II. Microenvironnement médullaire.....	70
A. Niche hématopoïétique.....	70
1. Composante cellulaire.....	71
2. Composante soluble.....	74
3. Composante hypoxique.....	74
B. Niche leucémique.....	77
1. Rôle permissif.....	77
2. Rôle conducteur.....	79
3. Rôle protecteur et mécanismes de résistance extrinsèques.....	80

III. AXL et les récepteurs TAM	85
A. Fonctions physiologiques des RTAM	85
1. Généralités.....	85
2. Activation des RTAM.....	87
3. Rôles des RTAM.....	93
B. Fonctions physiopathologiques des RTAM en Oncologie.....	96
1. Biologie des RTAM dans les cellules tumorales.....	96
2. Biologie d'AXL dans les LAM.....	99
3. Stratégies d'inhibition d'AXL	101
OBJECTIFS	104
RESULTATS	105
Article 1	106
Article 2	158
Article 3	168
DISCUSSION	174
CONCLUSION	181
BIBLIOGRAPHIE.....	183
ANNEXE.....	208
TABLE DES MATIERES	209
LEXIQUE.....	212

INTRODUCTION

I. Les Leucémies Aiguës Myéloblastiques

A. Généralités

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) sont un groupe hétérogène d'hémopathies malignes qui pourrait être défini par une infiltration de la moelle osseuse, du sang et éventuellement d'autres tissus, par des cellules hématopoïétiques proliférantes, clonales et anormalement ou pauvrement différenciées.¹ Au-delà de cet aspect clonal, les techniques de séquençage à haut débit ont démontré que les LAM sont des maladies dynamiques, impliquant la coexistence de multiples clones au sein d'un arbre phylogénétique complexe, modulé par les traitements.

1. Aspects épidémiologiques

Le dernier rapport de l'Institut National de Veille Sanitaire rapporte une incidence de 2791 nouveaux cas de LAM en France en 2012, dont 49 % chez l'homme. L'incidence est basse chez les sujets de moins de 40 ans puis augmente parallèlement dans les deux sexes jusqu'à 60 ans. Au-delà, le taux d'incidence augmente dans les deux sexes mais se sépare pour atteindre 30 et 19 pour 100 000, respectivement chez l'homme et chez la femme de 85 ans et plus. L'âge médian de survenue est de 71 ans. Si entre 1980 et 2012, une augmentation régulière du nombre de cas est observée,² les LAM restent des maladies rares au sens de la définition donnée par le groupe RAREcare.³

Cette incidence, en France, reste superposable à celle observée en Europe et 40% de l'augmentation du nombre de cas est attribuable aux changements démographiques. A l'avenir, en dehors de l'âge, il est vraisemblable que nous verrons apparaître une augmentation de l'incidence des LAM radio- ou chimio-induites, secondaires aux traitements utilisés en Oncologie, domaine dans lequel les délais de survie ne cessent de s'allonger.

2. Aspects diagnostiques

Le diagnostic positif d'une LAM reste cytologique avec $\geq 20\%$ blastes sur un myélogramme en dehors des anomalies génétiques t(8;21)(q22;q22.1), inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22) et t(15;17)(q22;q12) qui suffisent à poser le diagnostic quel que soit l'infiltrat blastique. La réalisation d'un immunophénotypage et d'explorations cytogénétiques et moléculaires sont recommandés au diagnostic pour l'évaluation pronostique relative à la maladie.⁴ La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé des pathologies myéloïdes, revue en 2016, définit des diagnostics d'entités leucémiques spécifiques en se basant, notamment, sur des anomalies cytogénétiques récurrentes, des anomalies moléculaires, les antécédents hémato-oncologiques des patients et leurs prédispositions constitutionnelles.⁵

3. Aspects thérapeutiques

Ce chapitre n'a pas pour ambition de faire une revue de la littérature argumentée sur l'ensemble des stratégies thérapeutiques discutées dans les LAM. Son objectif est de présenter simplement les points les plus consensuels, sur la base des dernières recommandations, sans prétendre à l'exhaustivité ou à leur critique plus ou moins éclairée.

a. Facteurs pronostiques

Une fois le diagnostic posé, les facteurs pronostiques doivent être dressés, ils guideront la prise en charge thérapeutique. Ils sont subdivisés en deux groupes, ceux relatifs au patient et ceux relatifs à la maladie.

Les premiers incluent l'âge, les antécédents et les comorbidités. Ils modulent la tolérance aux traitements et sont généralement responsables de mortalité précoce. Même si cette mortalité liée au traitement diminue grâce à l'amélioration des traitements de support,⁶ l'évaluation initiale d'un patient mesurera toujours en premier lieu sa capacité à supporter une chimiothérapie intensive. Bien que partielle, l'évaluation sur l'âge reste parmi les meilleurs moyens de prédire cette mortalité précoce, idéalement associée à des scores basés sur les capacités physiques et cognitives.^{7,8}

Si le patient est apte à supporter une chimiothérapie intensive, la question du bénéfice à en attendre doit être posée. Il s'agit d'évaluer les facteurs pronostiques relatifs à la maladie. Ils incluent les anomalies génétiques, chromosomiques et moléculaires, qui augmentent le risque de résistance primaire au traitement et de rechute. Si la première classification de l'« European Leukemia Net » (ELN) n'était qu'une manière standardisée de reporter les anomalies cytogénétiques et moléculaires dans les essais cliniques,⁹ la version révisée de 2017 est une véritable classification pronostique.⁴ Cette nouvelle stratification du risque des LAM inclut, *en sus* des mutations de *FLT3*, *NPM1* et *CEBPα*, les mutations des *RUNX1*, *ASXL1* et *TP53* (Tableau 1).

Dans cette classification, les mutations de type duplication interne en tandem (« Internal Tandem Duplication » ou ITD) du *FLT3* (FLT3-ITD), se trouvent dans les trois catégories de risque en fonction de leurs associations aux mutations de *NPM1* et du ratio allèle ITD/ allèle sauvage (« Wild type » ou WT). Les données chiffrées sur la survie des malades selon ces nouveaux sous-groupes pronostiques, à l'issue d'une procédure de traitement intensive, sont actuellement manquantes. Schématiquement, et par analogie avec deux publications sur la classification ELN 2010, on peut considérer que chez les sujets de moins de 60 ans, la survie globale à 3 ans sera de l'ordre de 60-70%, 30-40% et 10-20% respectivement dans les sous-groupes favorables, intermédiaires et défavorables. Chez les patients d'âge supérieur ou égal à 60 ans, la survie globale à 3 ans sera de l'ordre de 30-40%, 10-20% et < 5% respectivement dans les sous-groupes favorables, intermédiaires et défavorables.^{10,11}

Tableau 1 : Stratification du risque pronostique selon la classification ELN 2017, d'après Döhner *et al.*, *Blood* 2017.⁴

Catégorie de risque	Anomalies génétiques
Favorable	<p>t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></p> <p>inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p>Mutation de <i>NPM1</i> sans <i>FLT3</i>-ITD ou avec <i>FLT3</i>-ITD mais ITD/WT < 0,5</p> <p>Mutation biallélique de <i>CEBPα</i></p>
Intermédiaire	<p>Mutation de <i>NPM1</i> avec <i>FLT3</i>-ITD et ITD/WT ≥ 0,5</p> <p><i>NPM1</i> sauvage et <i>FLT3</i> sauvage, hors cytogénétique défavorable</p> <p><i>NPM1</i> sauvage et <i>FLT3</i>-ITD et ITD/WT < 0,5 (hors cytogénétique défavorable)</p> <p>Cytogénétique non favorable non défavorable</p>
Défavorable	<p>t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> réarrangé</p> <p>t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></p> <p>inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2/MECOM</i></p> <p>-5 or del(5q); -7; -17/abn(17p)</p> <p>Caryotype complexe (3 anomalies chromosomiques excluant les anomalies récurrentes suivantes, t(8;21), inv(16), t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3), t(3;3); t(9;22)</p> <p>Caryotype monosomique (monosomie autosomique + ≥1 anomalie chromosomique non CBF)</p> <p><i>NPM1</i> sauvage et <i>FLT3</i>-ITD et ITD/WT ≥ 0,5</p> <p>Mutation de <i>RUNX1</i> hors LAM de risque favorable</p> <p>Mutation d'<i>ASXL1</i> hors LAM de risque favorable</p> <p>Mutation de <i>TP53</i></p>

b. Chimiothérapie d'induction

Si le patient est apte à supporter une chimiothérapie intensive et s'il est susceptible de bénéficier d'une amélioration de sa survie ou de sa qualité de vie, la chimiothérapie d'induction doit être débutée. Elle reste la seule option curative en 2017, en dehors des LAM3 qui ne seront pas abordées ici. Cette dernière a peu évolué depuis la fin des années 70 : l'association de cytarabine et d'une anthracycline, internationalement reconnue comme consensuelle en 2017, a été testée pour la première fois en 1968.¹² Ce traitement, souvent dénommé « 3+7 » reste la référence. Il permet globalement l'obtention de 80% de rémission complète (RC) chez les patients de moins de 60 ans et de 60-70% chez les patients d'âge supérieur ou égal à 60 ans.

Récemment plusieurs intergroupes ont testé l'intensification des doses d'anthracyclines. La première étude, en première ligne chez les patients de moins de 60 ans, a démontré qu'une induction comportant de la daunorubicine à 90 mg/m²/jour permettait d'améliorer la survie globale en comparaison avec de la daunorubicine à 45 mg/m²/jour. Néanmoins, cet effet était limité au sous-groupe pronostique favorable/intermédiaire.¹³ La seconde retrouvait des résultats similaires chez des sujets d'âge supérieur ou égal à 60 ans avec de meilleurs taux de RC mais une amélioration de la survie globale uniquement retrouvée chez patients de 60 à 65 ans.¹⁴ Ces résultats sont à mettre en balance avec les doses habituellement utilisées, notamment en France, puisque la majorité des patients reçoivent de la daunorubicine à 60 mg/m²/jour. En effet, l'essai britannique AML17 a démontré que la dose de 90 mg/m²/jour ne donnait pas de meilleurs résultats que la dose à 60 mg/m²/jour.¹⁵ Une analyse en sous-groupe de cet essai a néanmoins démontré un bénéfice en survie globale et survie sans rechute de cette intensification pour les patients présentant une mutation de type FLT3-ITD, particulièrement pour ceux présentant un ratio ITD/WT élevé.¹⁶ Si ces essais testèrent l'intensification des doses d'anthracyclines de l'induction, d'autres étudieront l'intensification des doses d'aracytine en induction, néanmoins sans amélioration de la survie globale alors que la toxicité, notamment hématologique, était plus élevée.^{17,18}

En conclusion, le standard international reste une association de daunorubicine $\geq 60 \text{ mg/m}^2/\text{jour} \times 3 \text{ jours}$ (ou idarubicine $12 \text{ mg/m}^2/\text{jour}$ ou mitoxantrone $12 \text{ mg/m}^2/\text{jour}$) et de cytarabine $100 \text{ à } 200 \text{ mg/m}^2/\text{jour} \times 7 \text{ jours}$: le « 3+7 ». ⁴ A l'avenir, afin d'améliorer les résultats de cette chimiothérapie d'induction, certains médicaments seront potentiellement associés au « 3+7 » : le midostaurin, le gemtuzumab ozogamycin et la lomustine chez les sujets âgés.

c. Stratégies de post-rémission

Les stratégies de post-rémission comprennent des stratégies de traitement par chimiothérapies intensives avec ou sans support de greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) autologues ou allogéniques. A l'heure actuelle, les dernières recommandations ELN ne retiennent pas d'argument pour utiliser des polychimiothérapies intensives, ¹⁹ ou de fortes doses d'aracytine, ¹⁷ quel que soit le sous-groupe de patient. ^{17,20} Ces différents points pourraient être nuancés, ^{17,21} mais le standard international reste : cytarabine $1000\text{-}1500 \text{ mg/m}^2 \times 2/\text{jour}$ pendant 3 jours, pour 2 à 4 cycles. ⁴ Cette procédure de consolidation concerne les sujets de moins de 60 ans de risque favorable ou intermédiaire, alors éventuellement en association avec un procédure de greffe de CSH. Les sujets d'âge supérieur ou égal à 60 ans de risque favorable non-M3, aptes à recevoir de fortes doses d'aracytine à l'issue d'une induction peuvent aussi en bénéficier.

La consolidation par intensification thérapeutique suivie d'un support par greffe de CSH autologues permet d'obtenir une diminution du risque de rechute. En 2011, les intergroupes HOVON et SAKK ont publié une étude de phase 3 prospective testant l'intensification par Busulfan-Cyclophosphamide suivie d'autogreffe *versus* fortes doses d'aracytine chez des patients entre 16 et 60 ans, atteints de LAM, en première RC à l'issue d'une double induction, non éligibles pour une allogreffe. Cette étude a démontré un avantage pour l'autogreffe en termes de survie sans rechute sans différence en survie globale. ²² Même si la plupart des travaux actuels sont issus d'analyses rétrospectives, ^{23,24} les standards internationaux retiennent l'autogreffe comme un traitement de clôture chez les sujets < 60 ans de risque intermédiaire, en suggérant que les patients sélectionnés sur la base d'une maladie résiduelle négative seraient ceux en bénéficiant le plus.

Enfin, le traitement de clôture par greffe de CSH allogéniques est une des clés de la guérison des LAM, il s'agit de l'indication la plus consensuelle et de loin la plus fréquente de cette procédure de traitement. Si les possibilités de greffons (phéno-identiques, géno-identiques, non apparentés partiellement compatibles, sang de cordons placentaires et haplo-identiques) et les conditionnements atténués ont permis d'en étendre les indications, cette procédure ne concerne pas la majorité des patients du fait de leur âge, des comorbidités, des toxicités des chimiothérapies, des rechutes précoces, *etc.* Ce chapitre ne s'étendra pas sur les possibilités de greffe de CSH allogéniques dans les LAM. Nous retiendrons simplement que les standards internationaux recommandent l'allogreffe de CSH lorsque le risque de rechute dépasse 40% à l'issue d'un traitement de première ligne. Par ailleurs, la greffe de CSH allogéniques reste peu ou prou la seule option curative en rechute, en dehors des rares rechutes de LAM3. Dans les recommandations ELN, la greffe de CSH allogéniques reste recommandée avec des donneurs totalement compatibles, apparentés ou non, et pour des LAM de risque intermédiaire ou défavorable. Aucune recommandation n'est donnée pour les patients de plus de 60-65 ans.⁴

d. Stratégies de traitements non-intensifs

Globalement 30% des patients ne peuvent recevoir une chimiothérapie intensive et les alternatives sont limitées. En dehors de la prise en charge palliative avec traitements de support, l'aracytine à faible dose (20 mg x 2/jour pendant 10 jours tous les mois) est généralement bien tolérée et permet théoriquement d'obtenir des taux de RC de l'ordre de 18% et une légère amélioration de la survie globale, même si le pronostic reste très sombre avec une médiane de survie globale de moins de 6 mois.²⁵ Les agents déméthylants, notamment l'azacitidine, ne permettent l'obtention de RC que dans 20 à 25% des cas, mais ont démontré un prolongement de la survie globale et un certain niveau d'épargne transfusionnelle.^{26,27} De plus, ils semblent améliorer la qualité de vie, même si cela a été démontré plus formellement dans les syndromes myélodysplasiques (SMD).²⁸ Enfin, la décitabine a démontré une efficacité particulièrement importante dans les LAM présentant une mutation de *TP53*.²⁹ Les indications de ces options ne seront pas discutées ici, néanmoins elles ne sont pas considérées comme assez satisfaisantes puisque les experts s'accordent à dire que la meilleure option pour ces patients reste les protocoles de recherche clinique.⁴

Les LAM sont des hémopathies malignes relativement rares et de mauvais pronostic. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires, non seulement pour guérir les sujets jeunes mais aussi pour pouvoir traiter les patients les plus fragiles ne pouvant recevoir de chimiothérapie intensive.

Le traitement par chimiothérapie conventionnelle a peu évolué ces dernières décennies en dehors de l'intensification des doses d'anthracyclines qui semblent particulièrement efficaces chez les patients présentant une LAM FLT3-ITD.

L'ajout du midostaurin sera discuté dans le chapitre I.D.3. « Inhibiteurs de tyrosine kinase dans les LAM FLT3 mutées ».

B. Classifications des LAM

Contrastant avec des avancées thérapeutiques limitées malgré une intense activité de recherche clinique, académique et industrielle, les 10 dernières années ont vu des progrès rapides dans la connaissance des anomalies moléculaires liées au processus de leucémogénèse.

1. Caractérisation cytologique

Les LAM ont des caractéristiques qui ont amené, par analogie à l'hématopoïèse normale, à une première classification, cytologique et cytochimique : la classification « French-American-British » (FAB).³⁰ Utile dans les premières heures du diagnostic, sa valeur ajoutée sur le plan pronostique est quasi-nulle.

2. Caractérisation cytogénétique

Si le chromosome Philadelphie a été découvert en 1960 par P.C. Nowell et D.A. Hungerford,³¹ ce sont les travaux de J.D. Rowley qui identifieront les mécanismes génétiques qui en sont à l'origine.³² Elle établira ensuite que le substratum nosologique des leucémies aiguës est génétique, à travers la découverte des t(8;21) et t(15;17) au début des années 1970.³³ Ces deux gènes de fusion, secondaires à des translocations ou des inversions, ont rapidement été considérés comme initiateurs dans la leucémogénèse et la première classification de l'Organisation Mondiale de la Santé, en 1999,³⁴ avait pour but de moderniser la classification historique du FAB en incluant ces anomalies cytogénétiques.

Pendant des années, l'outil le plus puissant pour stratifier le pronostic des patients a été la cytogénétique du diagnostic, notamment les anomalies t(15;17) et les anomalies de type CBF, associées à un bon pronostic alors que les anomalies (3q), del(5q), (-5/-7) et caryotypes complexes étaient associées à un mauvais pronostic. Les anomalies moins fréquentes, mais récurrentes, ont finalement été incluses dans ces classifications grâce aux travaux à grande échelle de D. Grimwade.^{35,36}

Par la suite, les mutations de *FLT3*,³⁷ *CEBPα*,³⁸ et *NPM1*,³⁹ enrichiront cette classification cytogénétique, notamment pour les 45% de patients ne présentant pas d'anomalie chromosomique. L'étude de Schlenk *et al.*, publiée en 2008, a longtemps

défini la stratégie thérapeutique chez les patients atteints de LAM à caryotype normal,⁴⁰ puis par extension chez ceux ayant un caryotype de pronostic intermédiaire.

Finalement, les techniques de séquençage à haut débit dans de grandes cohortes de patients dévoileront non seulement un paysage moléculaire précis avec des mutations plus rares, mais aussi une architecture clonale spécifique.

3. Caractérisation moléculaire

Les mutations retrouvées dans les LAM sont généralement regroupées en 8 catégories d'anomalies (Tableau 2), (i) des voies de signalisation (*FLT3*, *KIT*, *RAS*, *PTPN11*), (II) des facteurs de transcription (*RUNX1*, *CEBPα*), (III) du complexe du spliceosome (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*), (IV) du complexe de la cohésine (*STAG2*, *RAD21*), mais aussi des modificateurs épigénétiques, avec (V) les modificateurs chromatinien (*ASXL1*, *ASXL2*, *EZH2*, *MLL*) et (VI) ceux impliqués dans la méthylation de l'ADN (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1* et *IDH2*).

Enfin, deux dernières catégories comprennent (VII) les gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*, *PTEN*, *PHF6*) et (VIII) les mutations de *NPM1*, isolées car les mécanismes sous-tendant leur rôle leucémogène restent encore mal définis (instabilité génomique,⁴¹ activation de *MYC*,⁴² surexpression des *HOX*,⁴³ délocalisation de *ARF*,⁴⁴ etc.).

Il est communément admis qu'en comparaison avec les tumeurs solides, les LAM présentent peu de mutations.⁴⁵ Cela suggère que d'autres facteurs, notamment épigénétiques, contribuent au processus de leucémogénèse.⁴⁶ En effet, les mutations impliquant des régulateurs épigénétiques représentent une grande part des mécanismes dérégulés : 44% des patients présentent une mutation dans les gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN et 30% dans les gènes impliqués dans les modifications chromatinien.⁴⁷

Tableau 2 : Catégories fonctionnelles des mutations classiquement retrouvées dans les LAM, d'après Bullinger *et al.*, JCO 2017.⁴⁷

Catégorie	Membres	Leucémogénèse	Incidence moyenne
Voies de signalisation	Kinases (<i>FLT3, KIT</i>) Phosphatases (<i>PTPN11</i>) RAS (<i>NRAS, KRAS</i>)	Avantage prolifératif	59%
Facteurs de transcription	<i>CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, RUNX1, CEBPα</i>	Différenciation hématopoïétique	40%
Complexe du spliceosome	<i>SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR2</i>	Dérégulation du processus d'épissage	14%
Complexe de la cohésine	<i>STAG2, RAD21</i>	Ségrégation chromosomique et dérégulation transcriptionnelle	13%
Modification chromatinienne	<i>ASXL1, ASXL2, EZH2, MLL fusions</i>	Dérégulation transcriptionnelle	30%
Méthylation de l'ADN	<i>DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2</i>	Dérégulation transcriptionnelle	44%
Suppresseurs de tumeur	<i>TP53, PTEN, PHF6</i>	Dérégulation transcriptionnelle	16%
NPM1	<i>NPM1</i>	-	27%

Les études à grande échelle décrivant le paysage mutationnel des LAM sont présentées dans le tableau 3. Les grandes lignes de ces études et les enseignements à tirer dans le cadre des LAM FLT3 mutées vont être rapidement envisagés.

Tableau 3 : Prévalence des mutations du FLT3 dans de grandes cohortes de patients atteints de LAM

Article	Année	N	Type LAM	Age médian (années)	Caryotypes	FLT3-ITD (%)	FLT3-TKD (%)
Schlenk et al.¹	2008	693	<i>De novo</i> et secondaires	48	Normaux	32%	12%
Ley et al.⁴⁸	2010	188	<i>De novo</i>	48	Indifférents	26%	
Patel et al.⁴⁹	2012	398	<i>De novo</i> et secondaires	47	Indifférents	30%	7%
TCGA⁵⁰	2013	200	<i>De novo</i>	55	Indifférents	28%	
Lindsley et al.⁵¹	2015	93	Secondaires	-	Indifférents	19%	
Papaemmanuil et al.⁵²	2016	1540	<i>De novo</i> et secondaires	-	Indifférents	22%	8%
Metzeler et al.⁵³	2016	664	<i>De novo</i> et secondaires	57	Indifférents	30%	9%
Faber et al.⁵⁴	2016	165	<i>De novo</i> et secondaires	-	CBF	2,4%	3%
Silva et al.⁵⁵	2017	93	<i>De novo</i> et secondaires	72	Indifférents	21%	8,6%

Dans une cohorte de 693 patients atteints de LAM *de novo* et secondaires, à caryotypes normaux, publiée par Schlenk *et al.* en 2008, les mutations FLT3-ITD ou ponctuelles au sein de son second domaine tyrosine kinase (« Tyrosine Kinase domain » ou TKD), étaient respectivement présentes chez 32% et 12% des patients. La mutation FLT3-ITD était le principal facteur de risque de décès et de rechute.⁴⁰ Dans la publication décrivant les mutations de DNMT3A, publiée par Ley *et al.* en 2010, les 188 patients atteints de LAM *de novo*, tous caryotypes confondus, présentaient une mutation de FLT3, ITD ou TKD, dans 26% des cas, respectivement chez 22% des patients DNMT3A non mutés et 41% des patients DNMT3A mutés ($p=0,003$).⁴⁸ Enfin, en 2012, dans une cohorte de LAM *de novo* et secondaires, Patel *et al.* ont retrouvé des mutations de FLT3, ITD et TKD, chez respectivement 30% et 7% des patients. La mutation FLT3-ITD était associée à une diminution de la survie globale, et était le premier facteur de risque de décès et de rechute chez les patients de cytogénétique intermédiaire. Finalement, ces travaux ont démontré que la stratification pronostique de Schlenk *et al.* pouvait être affinée sur la base d'anomalies chromosomiques (trisomie 8) ou des statuts mutationnels d'autres gènes : *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *MLL*, *PHF6*, *TET2*, *DNMT3A*, en sus des mutations dans les 3 gènes *FLT3*, *NPM1* et *CEBPα*.⁴⁹

En 2013, le Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) a réalisé un séquençage de génome complet ($n=50$) et un séquençage d'exome complet ($n=150$) associé à une analyse extensive des transcriptomes, miRnomes et méthylomes de 200 patients atteints de LAM *de novo* au diagnostic. Le nombre moyen de mutations en région codante était de 13, confirmant que l'instabilité génétique n'est pas un marqueur des LAM, sauf dans le cadre de LAM secondaires à cytogénétique complexe avec anomalie de *TP53*. Globalement, 23 gènes étaient retrouvés fréquemment mutés et 237 autres ont été retrouvés mutés à au moins deux reprises. Les mutations de *FLT3*, ITD et TKD, étaient présentes chez 28% des patients. Ensemble, elles étaient associées aux mutations de *NPM1*, de *DNMT3A* et aux anomalies du complexe cohésine. Enfin, le tri-génotype associant des mutations de *DNMT3A*, *NPM1* et *FLT3* était décrit comme une entité à part, non seulement par sa fréquence, mais aussi par une diminution massive de la méthylation de l'ADN comparée à des progéniteurs hématopoïétiques de donneurs sains : 71% de ces modifications épigénétiques concernaient des régions codantes et induisaient un profil transcriptionnel spécifique.⁵⁰

Dans une grande cohorte de 1540 patients atteints de LAM *de novo* et secondaires, publiée par Papaemmanuil *et al.* en 2016, les mutations de *FLT3*, ITD et TKD, étaient respectivement présentes chez 22% et 8% des patients. Ensemble, elles étaient associées à des mutations de *NRAS*, *NPM1*, *DNMT3A* et *TP53* mais aussi à des anomalies chromosomiques de type inv(16), t(6;9), del(17), del(7), del(5), et caryotypes complexes.⁵² Enfin, Metzeler *et al.* décrivent en 2016 des mutations de *FLT3*, ITD et TKD, respectivement chez 30% et 9% des patients. Les mutations *FLT3*-ITD étaient associées à des taux élevés de blastes dans le sang et la moelle osseuse, aux mutations de *DNMT3A* et *NPM1* et *TP53*, aux caryotypes normaux et complexes.⁵³

Trois études ont décrit la prévalence des anomalies de *FLT3* dans des sous-groupes particuliers :

En 2015, Lindsley *et al.* décrivent le paysage génétique d'une cohorte de 93 patients atteints de LAM secondaire. Les mutations de *FLT3*, ITD et TKD, étaient présentes chez 19% des patients. Cette étude démontrait par ailleurs qu'un set particulier de gènes, impliqués dans le spliceosome (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*), de régulateurs épigénétiques (*BCOR*), et de membres du complexe de la cohésine (*STAG2*) étaient particulièrement mutés dans les LAM secondaires. Ces anomalies, habituellement associées aux SMD, conféraient aux LAM *de novo*, un pronostic proche de celui des LAM secondaires. Les anomalies du *FLT3* étaient alors en 6^{ème} position des mutations les plus fréquemment retrouvées, après les mutations de *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *NRAS*, *TET2*, et *DNMT3A*.⁵¹

En 2016, dans une cohorte de 165 patients atteints de LAM de type CBF publiée par Faber *et al.*, incluant 87 LAM pédiatriques, les mutations de *FLT3*, ITD et TKD, étaient respectivement présentes chez 2,4% et 3% des patients. Elles étaient en 5^{ème} position des mutations les plus fréquemment retrouvées, après les mutations de *NRAS*, *KIT*, *ASXL2*, *NF1* et *WT1*, mais sans valeur pronostique particulière.⁵⁴

Enfin, dans une cohorte de 93 patients atteints de LAM, tous caryotypes confondus mais chez des patients d'âge médian de 72 ans (65-90) publiée par Silva *et al.* en 2017, les mutations de *FLT3*, ITD et TKD, étaient respectivement présentes chez 21% et 8,6% des patients. Les auteurs ont, par ailleurs, réalisé une analyse comparative avec la cohorte de Metzeler *et al.* qui comportait 376 patients d'âge

médian de 45 ans (18-59) et 288 patients d'âge médian de 67 ans (60-86). Dans ces analyses les patients d'âge supérieur à 60 ans étaient plus souvent atteints de LAM mutées dans les gènes du complexe du spliceosome (*SRSF2*, *ZRSR2*, *SF3B1* et *U2AF1*), habituellement associés aux LAM secondaires, et de LAM mutées au sein des modificateurs épigénétiques (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1&2* et *ASXL1*) habituellement associés aux hématoïèses clonales de pronostics indéterminés (« Clonal hematopoiesis of indeterminate potential » ou CHIP) dites pré-leucémiques. Les patients âgés présentaient plus de mutations de gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle (*RUNX1*, *BCOR*) et dans la réparation de l'ADN (*TP53* et d'autres décrits dans d'autres types tumoraux). Inversement, les mutations de *NPM1*, *GATA2*, *CEBPα*, *RAD21*, *KRAS*, *NRAS* et *WT1* étaient plus rares. Les auteurs démontrent par ailleurs que les patients présentant des mutations de *DNMT3A* ou de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN constituent un groupe pronostique à part en analyse multivariée. Cette forte relation pronostique suggérerait que le rôle leucémogène des mutations de *DNMT3A* dans la LAM passerait par un rôle fonctionnel dans la réparation de l'ADN. Ces résultats translationnels font écho à des résultats plus fondamentaux qui ont démontré que les mutations de type R882 de *DNMT3A* induisent un défaut de détection des dommages de l'ADN et donc des risques mutagènes plus élevés en réponse aux chimiothérapies de types intercalants, inhibiteurs de la topoisomérase II, tels que les anthracyclines.⁵⁶

La description des données brutes du paysage mutationnel des LAM au diagnostic doit être mise en perspective avec le caractère dynamique et évolutif de la pathologie qui naît d'une cellule initiatrice pour devenir une entité complexe et mouvante.

Les mutations de type FLT3-ITD concernent environ 30% des patients et sont de mauvais pronostic ; les mutations de type FLT3-TKD concernent environ 10% des patients et leur valeur pronostique est discutée.

C. Phylogénie des LAM

1. Cellule souche cancéreuse

La notion d'arbre phylogénétique implique la notion d'ancêtre commun, donc la notion de « cellule souche cancéreuse » ou CSC. En tant que concept, la CSC désigne « une cellule » dotée de propriétés spécifiques qui lui confèrent un caractère souche,⁵⁷ et un caractère cancéreux.⁵⁸ La preuve de l'existence d'une telle cellule est généralement associée aux travaux de l'équipe de J.E. Dick, publiés dans le modèle des LAM dans *Nature* en 1994.⁵⁹ En effet, seule une sous-fraction de cellules, présente au diagnostic, permet des reconstitutions sériées de phénotypes leucémiques dans des modèles de xénogreffes murines, définissant le caractère souche d'une cellule, que ce soit selon la théorie de J.E. Dick exposée ci-dessus, ou bien encore selon celle de I.L Weissman qui postule que la leucémogénèse peut aussi résulter de l'acquisition de capacités d'autorenouvellement dans un compartiment de cellules hématopoïétiques non multipotentes.⁶⁰

L'analyse épistémologique du concept de CSC révèle que certains chercheurs ont, d'emblée, fait preuve de leur scepticisme dans le caractère définitif de cette démonstration en mettant en avant, entre autres, le rôle de l'environnement : « *Ils sont peu nombreux mais nous en avons identifié un, Richard Hill, [...] : la transplantation dans des souris immunodéficientes, dit-il, ne récapitule pas l'environnement des cellules dans leur tumeur d'origine [...], [les cellules permettant des reconstitutions sériées] peuvent simplement être des cellules capables de produire leurs propres facteurs de croissance ou des cellules capables d'interagir avec le micro-environnement dans lequel elles sont injectées* ». ⁶¹ R.P. Hill plaidera pour un changement de paradigme,⁶² et une autre dénomination de la CSC : la cellule initiatrice de cancer (« Cancer Initiating Cell - CIC », ou « Leukemic Initiating Cell - LIC », ou « Tumor Initiating Cell - TIC, voire « SCID Leukemic Initiating Cell - SLIC »).⁶³

La cellule souche leucémique, que nous nommerons donc pour le reste de ce document « LIC », possède des déterminants non génétiques sous-tendant une organisation hiérarchique autour d'elle car ayant des capacités d'autorenouvellement, de quiescence et de chimiorésistance expliquant sa résurgence plusieurs mois ou années après un traitement initialement efficace. Ce caractère « souche » a

récemment été mis sous forme d'un score incluant la signature transcriptomique de 17 gènes corrélés aux capacités de greffes sériées, à la chimiorésistance et au pronostic des patients de manière extrêmement robuste. Parmi ces 17 gènes, 3 au moins codent pour des protéines impliquées dans l'interaction directe de la LIC avec son environnement (GPR56, CD34, CPXM1).⁶⁴ Les capacités spécifiques des LIC sont en lien avec leur localisation au sein de niches spécialisées médullaires,⁶⁵ caractérisées par un microenvironnement spécifique, critique pour leur maintenance et leur fonction. Depuis les travaux de J.E. Dick, il est largement admis que ces LIC sont au sein de la fraction blastique CD34⁺CD38^{low},^{59,66} et depuis une quinzaine d'années, différents clusters de différenciation ont été corrélés au phénotype de LIC plutôt qu'au phénotype normal des CSH : CD123,⁶⁷ CD44,⁶⁸ CLL-1,⁶⁹ CD25,⁷⁰ CD32,⁷⁰ CD96,⁷¹ CD47,⁷² et plus récemment CD45RA,⁷³ et TIM3,⁷⁴ cette liste n'étant pas exhaustive.

Quoiqu'il en soit, cette cellule initiatrice reste la cible thérapeutique idéale, mais sa définition au sein de l'arbre phylogénétique reste complexe. Sur le plan fonctionnel, une LIC est à la fois « souche » et « leucémique » et la notion même d'évolution clonale implique que plusieurs clones aient la définition de LIC au sein d'un même patient, sans pour autant avoir le même bagage génétique.

Cette notion est importante dans le ciblage thérapeutique des LAM FLT3-ITD, au-delà de toute considération sémantique sur le caractère « driver » ou non de la mutation. L'intérêt de ce ciblage reste central et ce point sera discuté dans le chapitre « I.D.3.a. Pertinence du ciblage thérapeutique des anomalies de type FLT3-ITD ».

2. Hématopoïèse pré-leucémique

Le vieillissement du système hématopoïétique a longtemps été résumé par une altération du compartiment des CSH et par un biais d'engagement myéloïde ou « Age-Associated Skewing ».⁷⁵ Plus tard, les études d'inactivation du chromosome X ont démontré que l'incidence des inactivations non aléatoires dans les cellules sanguines augmentait avec l'âge ; plusieurs hypothèses ont été discutées et, parmi elles, le concept d'« hématopoïèse clonale ».⁷⁶

Il faudra attendre 2012 pour que la preuve génétique en soit apportée par un séquençage d'exome complet sur cellules mononucléées sanguines, comparé à celui de cellules de l'épithélium buccal chez trois patients âgés. Une mutation somatique de

TET2 a été retrouvée, telle que celles décrites dans les hémopathies myéloïdes par Delhommeau *et al.*⁷⁷ Finalement, au sein d'une cohorte de 284 donneurs sains, ces mutations de *TET2* étaient présentes dans l'ADN des polynucléaires neutrophiles de 5,6% des donneurs de plus de 65 ans présentant un biais d'engagement myéloïde. On ne les retrouvait ni dans l'ADN des lymphocytes de ces mêmes donneurs, ni chez les donneurs sans biais d'engagement myéloïde, ni chez les patients de moins de 65 ans.⁷⁸ Ces résultats posaient les bases génétiques d'une hypothèse selon laquelle une mutation de *TET2* dans le compartiment des CSH induirait un avantage d'autorenouvellement, une expansion clonale, et enfin une hématopoïèse à prédominance myéloïde.

La notion d'« hématopoïèse clonale » était née, construisant un modèle selon lequel une mutation fondatrice allait faire le lit d'acquisitions mutationnelles sériées, chaque mutation offrant à la cellule une capacité pro-oncogénique spécifique selon les premiers « Hallmarks of Cancer » d'Hanahan et Weinberg.⁵⁸

En effet, la CSH, multipotente, représente un réservoir de capacités, une sorte de « copie de sauvegarde » sélectionnée dans l'évolution pour diminuer le risque de transformation cancéreuse. Ainsi, une anomalie génétique ne peut être transmise aux cellules filles que lorsqu'elle se produit dans une cellule ayant des capacités d'autorenouvellement ; dans l'autre cas, la mutation se perd dans la différenciation. Le risque d'évènement génétique augmentant avec les divisions cellulaires, l'évolution a sélectionné un modèle dans lequel le risque de corruption de la copie initiale était quasi-nul car celle-ci se divisait très rarement. Certains travaux ont tenté de mettre en évidence une relation linéaire entre l'incidence des mutations dans des cellules capables d'autorenouvellement et le risque de cancer.⁷⁹ Ces travaux ont été critiqués, non seulement en raison de la notion même d'évaluation du nombre de cellules souches dans un tissu,⁸⁰ mais aussi en raison de l'absence de prise en compte de différences ethniques,⁸¹ de l'environnement,⁸² et du microenvironnement.⁸³

Globalement, la vision finaliste de la modélisation de ce processus était critiquée, basée uniquement sur l'acquisition sériée de mutations, faisant fi des processus oncogéniques non mutationnels (épigénétique, microenvironnement, *etc.*) et de leurs interactions. Ces processus créent un environnement permissif à l'apparition d'un cancer patent, sur le modèle de ce qui a été théorisé par R. Schreiber

vis-à-vis de l'« immunoediting ».^{84,85} Si ce raisonnement peut s'appliquer à d'autres processus non immunologiques, le processus d'acquisition sériée de mutations n'en est pas moins réel.

Il a été démontré que l'accumulation d'un marqueur, initialement présent dans une CSH « long terme » murine, passe dans le compartiment CSH « court terme » en un an, dans le compartiment des progéniteurs multipotents en 3 mois et enfin dans les compartiments des progéniteurs myéloïdes communs et lymphoïdes communs respectivement en 1 jour et 2 mois.⁸⁶ Cette remarquable lenteur illustre une fréquence très faible des divisions cellulaires dans l'hématopoïèse précoce et est probablement à mettre en relation avec la faible prévalence des mutations retrouvées dans les LAM.⁴⁵

La nécessité d'acquérir plusieurs mutations dans un compartiment de cellules ayant des capacités d'autorenouvellement, et la faible incidence des divisions de ce groupe de cellules, étaient deux notions antinomiques dans la compréhension de certains processus de leucémogénèse, sauf à considérer des mutations conférant elles-mêmes des capacités d'autorenouvellement. Le modèle d'hématopoïèse pré-leucémique de type CHIP permet de réconcilier ces deux postulats. Les premières mutations, permettent une expansion clonale au sein du pool de CSH, permettant leur maintien dans le temps et donc la capacité d'acquérir les évènements génétiques supplémentaires nécessaires à une leucémogénèse aboutie.⁸⁷

Par la suite, de nouvelles publications vont rapidement mettre en avant le rôle primordial des autres modificateurs épigénétiques dans ces mécanismes, notamment à travers les mutations de *DNMT3A*, retrouvées non seulement dans les lignages myéloïdes mais aussi lymphoïdes normaux.⁸⁸ Enfin, des études à large échelle ont démontré qu'au-delà de *TET2* et de *DNMT3A*, d'autres gènes étaient impliqués tels qu'*ASXL1*, *SF3B1*, *JAK2*, etc.⁸⁹ Ces CHIP ont été corrélées à une augmentation du risque d'hémopathies malignes mais aussi à une augmentation du risque de décès, incluant des causes non-cancéreuses.⁹⁰⁻⁹² Finalement, des techniques de séquençage ultrasensibles ont démontré que si l'incidence augmente avec l'âge, la présence de CHIP est sous-évaluée chez les plus jeunes puisque 95% des individus de 50 à 60 ans sont porteurs d'hématopoïèses clonales, infimes mais réelles, permettant la comparaison des CHIP avec les gammopathies monoclonales de

signification indéterminée ou bien encore avec les lymphocytoses B monoclonales sans critère de Leucémie Lymphoïde Chronique.⁹³

3. Evolution clonale

Avant l'ère du séquençage à haut débit, les travaux sur l'évolution clonale passaient par des analyses cytogénétiques et avaient déjà démontré que (i) dans la majorité des cas, les anomalies chromosomiques initiales persistent malgré de possibles acquisitions, (ii) une minorité de cas perdent leur anomalie et (iii) une dernière partie de patients présentent des anomalies sans aucun point commun avec celles du diagnostic.⁹⁴ Certains travaux ont démontré que 40% des patients présentaient, à la rechute, une perte d'hétérozygotie (« Loss of Heterozygosity » ou LOH) qui impliquait fréquemment le chromosome 13 (LOH_{13q}).^{95,96} Ces travaux suggéraient ce qui fut démontré plus tard avec des techniques plus sensibles : les mutations de type FLT3-ITD rendent les cellules tellement dépendantes de leur oncogène qu'elles en perdent l'allèle sauvage à travers une LOH_{13q}.⁹⁷

La notion de mutation « driver » ou conductrice dans les LAM reste débattue. Dans la cohorte du TCGA, par exemple, les mutations de *NPM1*, *CEBPα* ou *RUNX1* sont mutuellement exclusives avec les translocations récurrentes amenant à des modifications de facteurs de transcription, suggérant qu'elles sont conductrices.⁵⁰ Néanmoins, dans des modèles murins, il a été démontré que les mutations de *NPM1* augmentaient l'autorenouvellement des cellules et la myélopoïèse, mais seulement 30% des souris développaient un phénotype de LAM. Un long délai de latence était nécessaire, suggérant que l'acquisition d'événements génétiques complémentaires était requise, incluant des anomalies de *FLT3*.⁹⁸ Inversement, les mutations isolées de *FLT3* déclenchent, dans un modèle murin, un phénotype plus proche d'un syndrome myéloprolifératif (SMP) que d'une LAM,⁹⁹ alors que la co-existence avec une mutation de *DNMT3A* induit une transformation leucémique rapide.¹⁰⁰

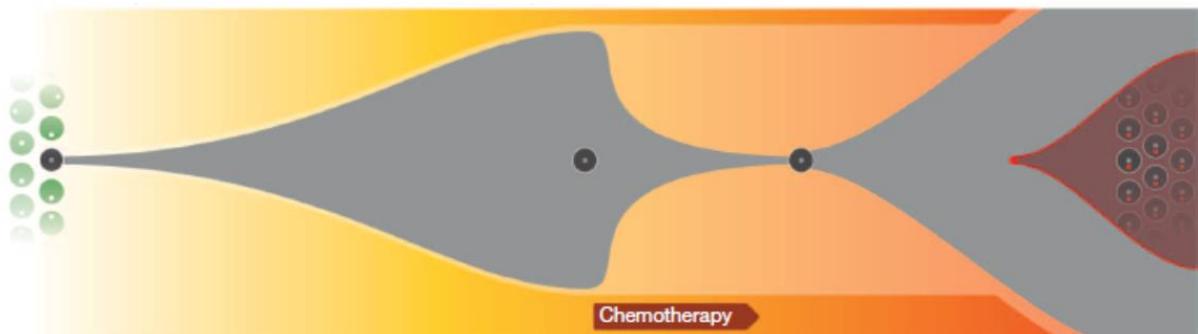
Finalement, l'observation des co-occurrences mutationnelles révélera que les mutations au sein des gènes de la signalisation (*FLT3*, *KIT*, *RAS*) sont associées aux translocations impliquant des facteurs de transcription (*PML-RARA*, *CBFB-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*). Cette observation s'accorde avec la théorie de D.G. Gilliland du « double hit leucémique » impliquant la coopération de mutation de classe I, touchant

des gènes de la signalisation et conférant un avantage prolifératif, avec celles de classe II, bloquant la différenciation.¹⁰¹ Néanmoins, les techniques de séquençage à grande échelle démontrent maintenant que ce modèle n'est pas définitif car non pertinent pour près de 40% des patients qui ne présentent pas de mutation dans les gènes de la signalisation.¹⁰²

Les études de séquençage à haut débit ont permis de documenter plus précisément l'acquisition sériée des mutations et l'évolution clonale observée à la rechute. La sensibilité des techniques de séquençage permet en effet de quantifier la fréquence des allèles variants. En bref, plus la fréquence de l'allèle variant est élevée, plus la mutation est présente et plus on suppose qu'elle est précoce dans la leucémogénèse. Néanmoins, les fréquences d'allèles variants très élevées peuvent aussi être associées à des LOH telles qu'on peut les voir dans les LAM FLT3-ITD.

Le message fondateur, issu de travaux initiaux sur 8 patients séquencés au diagnostic et à la rechute, est que le clone à la rechute peut être issu du clone « fondateur » qui a acquis des mutations complémentaires après la rechute ou bien qu'il s'agit d'un sous-clone du diagnostic ayant survécu au traitement et ayant éventuellement acquis des mutations complémentaires (Figure 1).¹⁰³

Modèle 1



Modèle 2

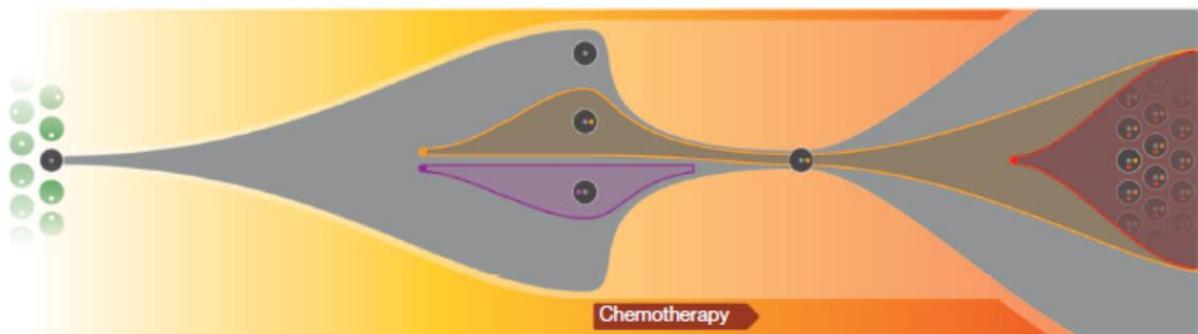


Figure 1 : Modèles d'évolutions clonales de LAM en rechute, d'après Ding *et al.*, *Nature* 2012.¹⁰³ Le modèle 1 montre que le clone dominant au diagnostic évolue au sein de la rechute, associé à l'acquisition de mutation(s) supplémentaire(s). Le modèle 2 montre qu'un clone mineur du diagnostic, porteur de la plupart des mutations, résiste à la chimiothérapie puis s'expand à la rechute, là encore associé à l'acquisition de mutation(s) supplémentaire(s).

Par la suite, c'est l'analyse des LAM secondaires aux SMD qui suggérera que les deux hémopathies sont aussi clonales l'une que l'autre, quel que soit le degré d'envahissement blastique médullaire. Le clone fondateur du SMD est systématiquement présent au stade de la LAM secondaire, bien que parfois dépassé par un clone-fille ayant acquis des mutations supplémentaires (Figure 2).¹⁰⁴

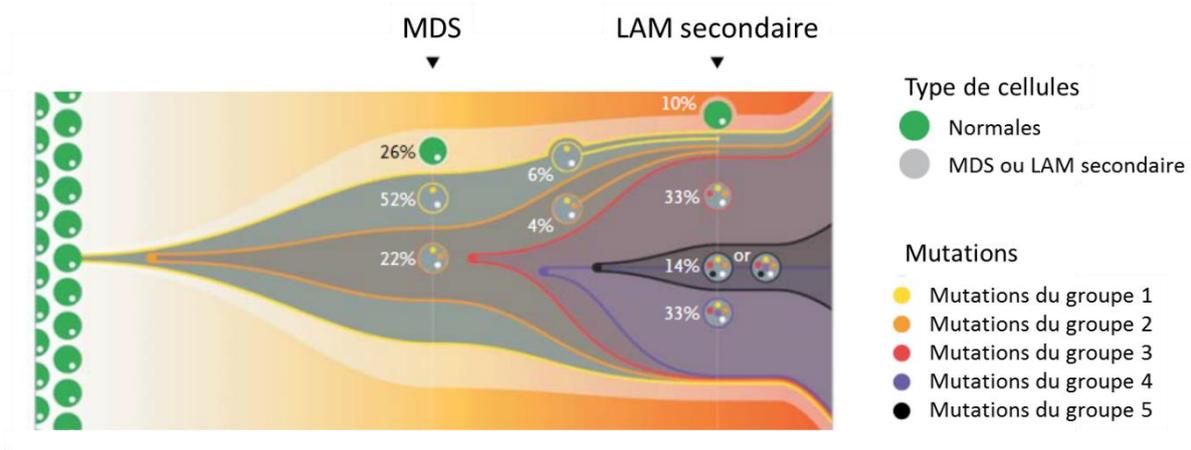


Figure 2 : Modèle d'évolution clonale : du SMD à la LAM secondaire, d'après Walter et al., *N Engl J Med* 2012.¹⁰⁴ Ce modèle montre que le clone du groupe 1 (jaune) représente 52+22%=74% des cellules de la moelle au diagnostic de SMD. Le clone du groupe 2 (orange), issu du clone 1, est largement prédominant au moment de l'évolution en LAM secondaire, mais après avoir acquis des mutations complémentaires (clones 3 en rouge, puis clone 4 en violet. Enfin un 5^{ème} clone (noir), d'évolution plus tardive, représente 14% des cellules médullaires au moment du diagnostic.

Enfin, dans le cadre des LAM FLT3-ITD, des travaux en « Single Cell Analysis » viendront démontrer que les mutations de type FLT3-ITD sont des événements tardifs dans la leucémogénèse et que si l'événement de LOH_{13q} est présent au diagnostic, il est plus fréquent à la rechute.⁹⁷ Sur la base des analyses du TCGA, 50% des patients ont au moins deux clones détectables au diagnostic et il est dorénavant admis que l'arbre phylogénétique des LAM implique souvent des mutations dites de CHIP, considérées pré-leucémiques, suivis d'événements additionnels. A la rémission, les

clones CHIP persistent et peuvent éventuellement conduire à une rechute ou à une seconde maladie (Figure 3).¹⁰⁵

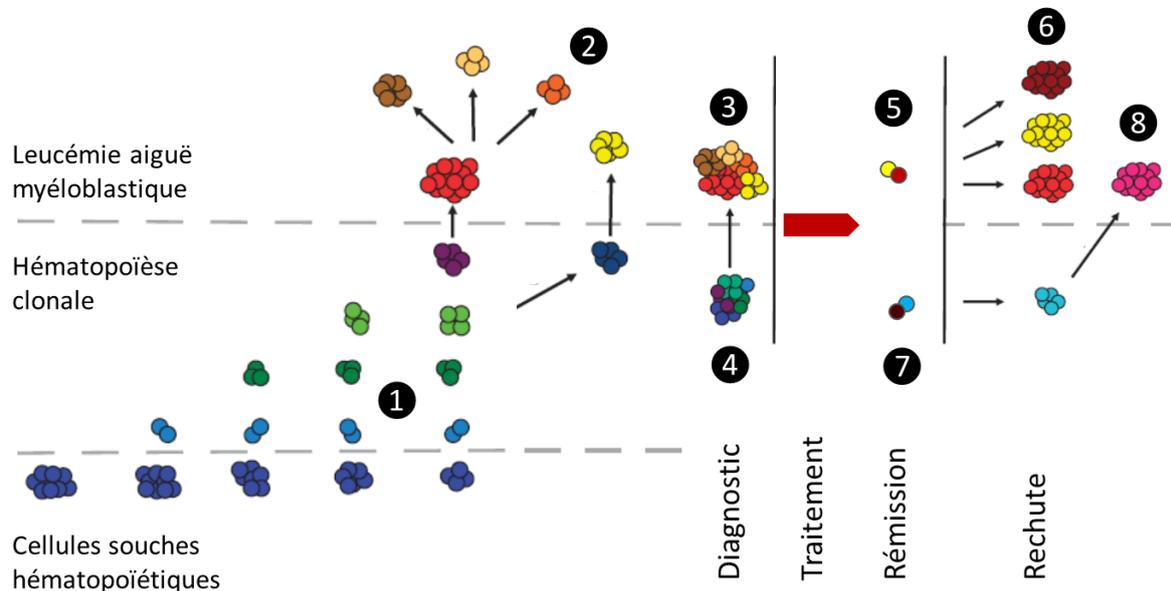


Figure 3 : Modèles de rechutes en présence d'une hématopoïèse clonale, d'après Jan et al., *Oncogene* 2013.¹⁰⁵ Ce modèle montre que plusieurs mutations aboutissent à un clone leucémique. Les mutations doivent se produire dans une cellule dotée d'autorenouvellement, avec apparition de différents clones (axe X) ①, avant d'aboutir à une authentique LAM (axe Y) ②. Au diagnostic, les cellules blastiques (couleurs chaudes) sont hétérogènes ③, mais les cellules d'hématopoïèse normale, clonale ou non (couleurs froides), le sont aussi ④. Le traitement aboutit à la rémission cytologique, donc à l'élimination de la majorité des cellules clonales, mais persistent des clones leucémiques ⑤ pouvant aboutir à la résurgence de la maladie avec ou sans évolution clonale complémentaire ⑥. Une autre modalité de rechute est une nouvelle évolution clonale à partir des cellules de CHIP ayant persisté à l'issue de traitement ⑦, et qui acquièrent à nouveau les mutations nécessaires ⑧.

Enfin, il a récemment été démontré que les notions d'évolution clonale et d'arbre phylogénétique ne concernaient pas seulement les anomalies cytogénétiques et moléculaires, mais aussi les modifications épigénétiques. Ces travaux ont démontré la présence d'une diversité épiallélique, qui semblait indépendante de l'hétérogénéité génétique, de l'âge, et surtout des mutations de *DNMT3A*, *TET2* et *IDH1&2*. Les

auteurs proposent de diviser les patients atteints de LAM en trois catégories : (i) ceux ayant une diversité épiallélique élevée et peu de mutations somatiques (groupe dit « epigenetically driven »), (ii) ceux ayant une diversité épiallélique faible et de nombreuses mutations somatiques (groupe dit « genetically driven ») et enfin (iii) ceux sans profil particulier. Les auteurs avancent d'ailleurs l'hypothèse que l'acquisition d'un épigénome modifié se ferait sous la pression du microenvironnement.¹⁰⁶ Cet aspect épigénétique de l'hétérogénéité clonale des LAM est un argument supplémentaire contre la vision déterministe du cancer visant à le considérer comme uniquement secondaire à des altérations de l'ADN. Le lien entre génotype et phénotype n'en est que moins linéaire, sans compter sur les autres processus, d'« editing », qui ne font qu'amplifier ce phénomène.

Finalement, les modèles d'évolution clonale actuellement les plus consensuels impliquent trois types d'acquisitions sériées (Figure 4).¹⁰⁷

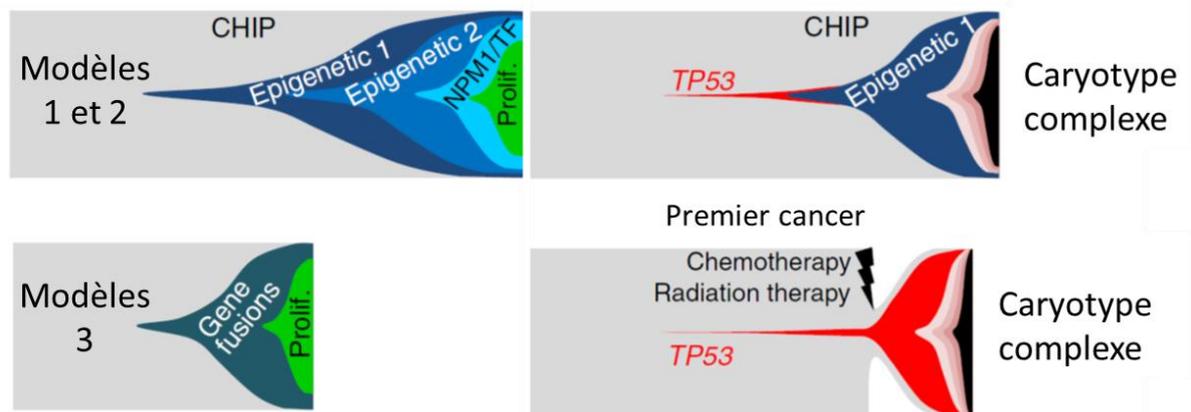


Figure 4 : Modèles d'acquisition de mutations avant d'aboutir à un phénotype de LAM, d'après Hirsch et al., Nat Comm 2016.¹⁰⁷

Le premier, et le plus fréquent, débute par une mutation dite CHIP ou pré-leucémique (*DNMT3A*, *TET2* ou *ASXL1* pour les plus emblématiques) puis au sein du clone muté, apparaît une mutation de *NPM1* ou une mutation impliquant un facteur de transcription (*RUNX1*), et enfin des anomalies impliquant les voies de signalisation (*FLT3*, *RAS*). Le deuxième est similaire mais se produit sans anomalie de type CHIP

préalable. Le troisième, implique un évènement fondateur à travers une translocation impliquant une anomalie de type CBF ou MLL dont résultent une dérégulation épigénétique et une dérégulation de facteurs de transcription hématopoïétiques. Les mutations dans les gènes de la signalisation se produisent aussi (*KIT*, *FLT3*, *RAS*) mais ne sont pas nécessaires au processus leucémogène.

Deux modèles supplémentaires peuvent être décrits : (i) celui impliquant les mutations de *TP53* est particulier car il est souvent secondaire à la présence d'un clone muté associé à l'âge, susceptible d'évoluer après la perte d'une pression de sélection par le reste de l'hématopoïèse, typiquement après une chimiothérapie pour un autre cancer par exemple, à laquelle il aura été naturellement résistant. Enfin, (ii) les modèles dans lesquels l'évènement initial est « absent » car « intrinsèquement présent », dans le cadre des prédispositions constitutionnelles. Il est démontré que les traitements, à visée anti-néoplasique ou non, sont susceptibles de modifier ces évolutions clonales.^{103,108,109}

Le paysage génétique actuel des LAM est probablement figé et très proche de la réalité, de par la facilité d'accès à un échantillon de tumeur homogène. La situation est différente dans les tumeurs solides dans lesquelles l'hétérogénéité génétique intratumorale est fréquemment sous-estimée.¹¹⁰

Cette caractérisation a mis en évidence différents modèles ayant positionné les mutations de *FLT3* comme tardives dans la leucémogénèse.

D. Le récepteur tyrosine kinase Fms-like tyrosine kinase 3

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) sont une famille de récepteurs transmembranaires qui traduisent un signal du milieu extra-cellulaire vers le secteur intra-cellulaire. Ils régulent ainsi des processus cellulaires physiologiques variés : survie, croissance, différenciation, adhésion et mobilité. L'expression anormale ou l'activation constitutive de ces récepteurs confèrent à la cellule des propriétés oncogéniques impliquées dans de nombreux cancers, conduisant à un intérêt majeur en thérapeutique.

Les TK n'ont été identifiées que chez les métazoaires, contrairement aux serine/threonine kinases présentes dès les eucaryotes unicellulaires. Parmi les 90 TK identifiées dans le génome humain, 58 sont des récepteurs distribués en 20 familles selon la séquence d'acides aminés de leur TKD et la structure de leur domaine extra-cellulaire (« Extra cellular domain » ou ECD).

1. Rôle du FLT3 dans l'hématopoïèse normale

Localisé en 13q12, le gène du « *Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)* » ou « *fetal liver kinase-2 (FLK-2)* » ou encore « *human stem cell kinase-1 (STK-1)* » a été cloné en 1991.¹¹¹ Celui de son ligand, le *FLT3-ligand*, le sera deux ans plus tard.¹¹²

L'ARN code pour une protéine de 993 acides aminés, exprimée principalement dans le système hématopoïétique : lignages myéloïde et lymphoïde. Il existe différents variants d'épissages alternatifs, fréquemment retrouvés dans les LAM, dont les conséquences fonctionnelles et pronostiques restent mal connues.¹¹³

Le récepteur TK FLT3 est synthétisé, puis partiellement glycosylé dans le réticulum endoplasmique (forme minoritaire, intra-cellulaire, de 130 kDa) avant d'être transporté vers l'appareil de Golgi où sa glycosylation se poursuit avant d'être transporté à la membrane plasmique (forme majoritaire, à la membrane, de 160 kDa). Cette protéine appartient à la famille des RTK de classe III, incluant aussi FMS, PDGFR et KIT, caractérisée par un ECD composé de 5 domaines « immunoglobulin-like ». Il porte ensuite un domaine transmembranaire (« Transmembrane domain » ou TMD), un domaine juxta-membranaire (« Juxta Membrane domain » ou JMD) impliqué dans sa dimérisation (subdivisé en « JM-Binding domain » qui stabilise la conformation

inactive, « JM-Switch » qui porte le domaine de liaison à STAT5 et enfin « JM-Zipper » qui permet le repliement du récepteur), un premier domaine tyrosine kinase (TKD1) (subdivisé en « $\beta 1$ sheet », « Nucleotide Binding Loop » et « $\beta 2$ sheet »), puis un second (TKD2), séparés par une séquence d'insert (Figure 5).¹¹⁴

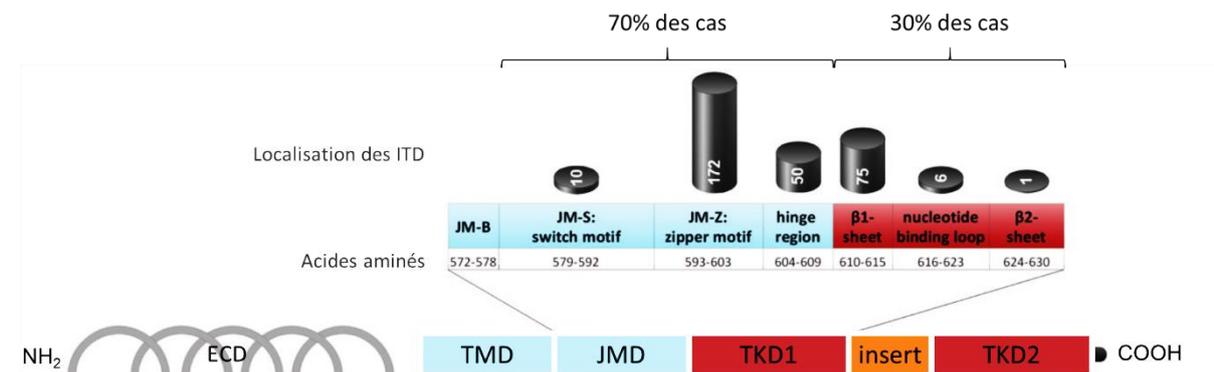


Figure 5 : Représentation schématique du récepteur FLT3 et localisation des ITD, d'après Kayser *et al. Blood* 2009.¹¹⁵ En bleu, le domaine JMD est porteur de 70% des mutations de type ITD, en rouge le TKD1 est porteur de 30% des mutations de type ITD. Le TKD2 porte les mutations ponctuelles de type D835.

Le FLT3-ligand (FL) est une protéine transmembranaire qui peut être relarguée sous forme d'homodimères solubles.^{116,117} Ces deux formes du ligand, transmembranaire et soluble, sont capables d'activer le FLT3. Le FL est exprimé par de nombreux tissus avec une expression maximale par les cellules mononucléées sanguines. L'expression par de nombreux tissus du FL contraste avec le profil d'expression de son récepteur, principalement retrouvé dans les progéniteurs hématopoïétiques, suggérant que c'est le FLT3 lui-même qui détermine la spécificité tissulaire de leur action commune. Néanmoins, ces données restent sujettes à caution puisque la plupart des études ont étudié le niveau d'ARN du FL, ne préjugant pas de son expression protéique.¹¹⁸

A l'état basal, le FLT3 est monomérique, non phosphorylé et porteur d'une kinase inactive. Lors de la fixation de son ligand, le récepteur subit une modification

conformationnelle, expose son domaine de dimérisation et permet une interaction homodimérique par l'intermédiaire du JMD. Cette dimérisation conduit à la phosphorylation des tyrosines Y₅₈₉ et Y₅₉₁ du JMD, supprimant l'effet de sa boucle auto-inhibitrice, déclenchant l'activité kinase du récepteur et l'activation de différentes voies de transduction (Figure 6).

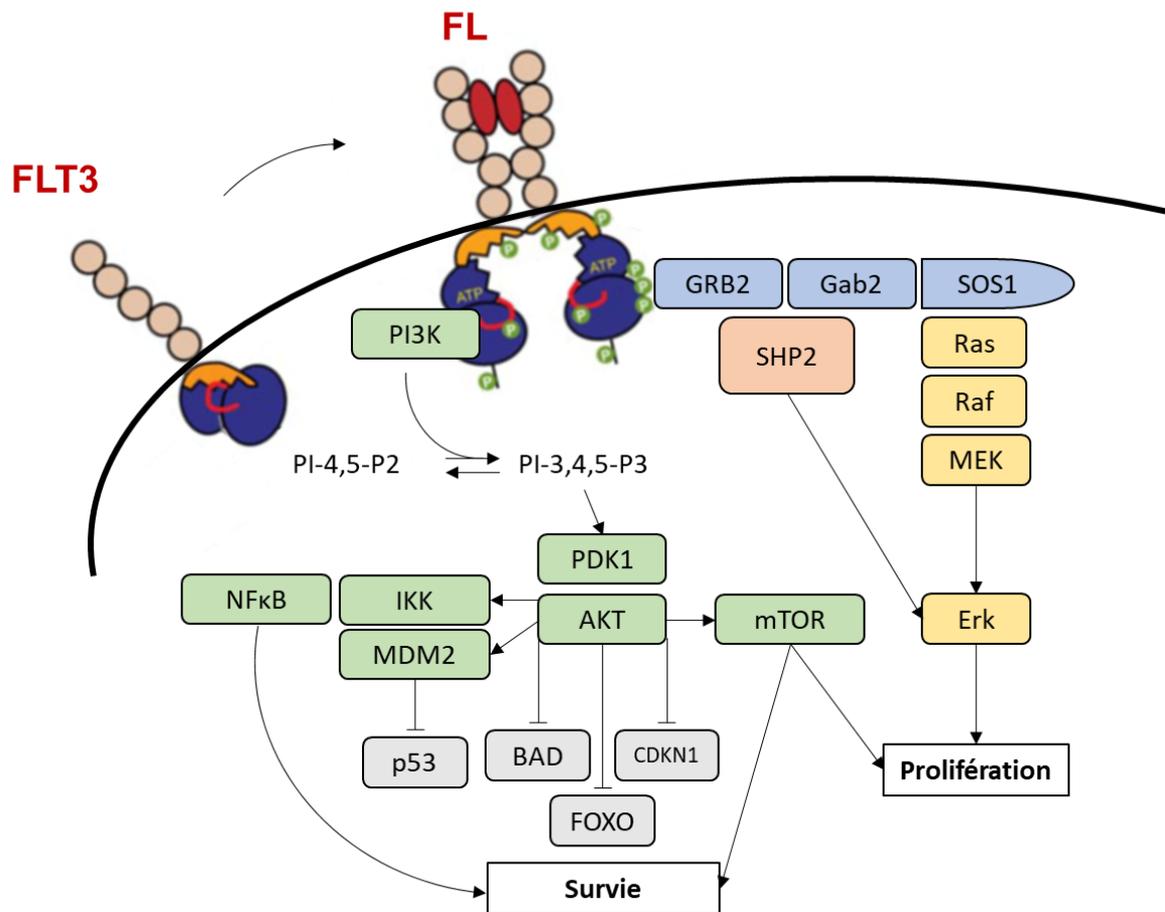


Figure 6 : Représentation schématique et simplifiée des voies de transduction du signal en aval du FLT3, à l'issue de la fixation de son ligand, d'après Stirewalt & Radich, *Nat. Rev. Cancer* 2003.¹¹⁸ En jaune la voie des MAPK, en vert la voie des PI3K.

La voie des « Mitogen-associated protein kinase » ou MAPK est constituée d'une famille de serine/threonine kinases activées de plusieurs façons par les RTK, dont le récepteur FLT3. A l'issue de l'activation des TKD du FLT3, les Y₇₆₈, Y₉₅₅, et Y₉₆₉ recrutent les protéines adaptatrices GRB2 et Gab2. Ces dernières peuvent

recruter SOS1 qui active les GTPases RAS qui active Raf puis les kinases MEKs, et enfin les Erks. GRB2 et Gab2 peuvent aussi recruter la phosphatase SHP2, qui semble participer à une activation directe des Erks. Enfin, les protéines Erks vont activer des facteurs de transcription tels que ELK1, ETS, JUN, MYC et SP1 qui induisent l'expression de nombreux gènes stimulant typiquement la prolifération cellulaire, la plupart étant connus comme proto-oncogènes.¹¹⁹

Le voie du « Phosphatidylinositol-3-kinase » PI3K/AKT suit un chemin parallèle à la voie des MAPK et y est interconnectée au niveau de RAS. La PI3K est une « lipide kinase » hétérodimérique, constituée de deux sous-unités p110 et p85, dotée d'un domaine SH2 qui lui permet d'être recrutée au niveau des tyrosines phosphorylées des RTK au même titre que GRB2. Accessoirement, la PI3K peut être activée par RAS. La PI3K va assurer la phosphorylation d'un lipide membranaire, le PI-4,5-diphosphate (PI-4,5-P2) pour le transformer en PI-3,4,5-P3. Ce mécanisme est contrebalancé par la phosphatase PTEN. Ce PI-3,4,5-P3 recrute la PDK1 qui active les serine/threonine kinases AKTs. Ces dernières vont phosphoryler plusieurs substrats, entraînant la modification de leur activité. Sans prétendre à l'exhaustivité, on peut citer : inhibition de TSC2 qui aboutit indirectement à l'activation de mTOR impliquée dans la synthèse protéique et l'inhibition de l'autophagie, inactivation de BAD impliquée dans la régulation de l'apoptose, activation de MDM2 qui s'oppose aux fonctions de p53, inactivation de CDKN1 stimulant l'entrée en cycle cellulaire, activation d'IKK qui aboutit indirectement à l'activation de NFκB, inactivation des FOXOs inducteurs d'apoptose. L'ensemble de ces mécanismes converge globalement vers une fonction anti-apoptotique de la voie PI3K/AKT.¹¹⁹

Au-delà des MAPK et de PI3K/AKT, d'autres voies d'aval peuvent être activées : la voie des « Src family kinases » SFK comprend, entre autres, SRC, FYN, LYN et LCK. Les Y₅₈₉, Y₅₉₁ et Y₅₉₉ ont été suggérées comme site de liaison du FLT3 à SRC. Les SFK participent à la régulation de nombreux processus cellulaires incluant prolifération, différenciation, migration et survie cellulaire. Parmi cette famille, LYN semble être spécifiquement activée dans la cadre des FLT3-ITD alors qu'elle ne l'est pas classiquement par le FLT3-WT.¹²⁰ Des interactions physiques ont aussi été décrites avec la PLCγ1 et Ship, régulatrices du métabolisme du PI-4,5-P2. D'autres interactions, indirectes, ont aussi été décrites avec CBL et CBLB, impliqués dans le complexe ubiquitine-ligase et donc dans la dégradation par le protéasome.¹¹⁸ Enfin, il

semblerait que STAT5 puisse être activé indépendamment de la voie JAK, ce point est controversé puisque certains auteurs considèrent que l'activation de STAT5 par le FLT3 ne se produit que dans le contexte spécifique des mutations de FLT3. Ce point sera développé dans le chapitre I.D.2.a. « Les mutations de type FLT3-ITD ».¹²¹

En termes fonctionnels, le FLT3 est principalement exprimé par les progéniteurs multipotents, et les progéniteurs myéloïdes communs et lymphoïdes communs. Son expression est nulle dans les lignées érythroïdes et mastocytaires, diminue avec la différenciation dans les lignées mégacaryocytaire, granuleuses et lymphoïdes. Son expression, théorique et controversée, par les CSH elles-mêmes sera discutée dans le chapitre I.D.3.a. « Pertinence du ciblage thérapeutique des anomalies de type FLT3-ITD ».

Sur le modèle de son homologue le Stem Cell Factor (SCF) pour le récepteur KIT, le FL n'induit pas, seul, une forte prolifération des progéniteurs hématopoïétiques. En revanche, il exerce une activité très fortement synergique avec d'autres facteurs de croissance et interleukines, tels que l'IL-3, l'EPO et le GM-CSF sur les progéniteurs myéloïdes.¹¹⁶ Parallèlement, il exerce aussi une activité synergique avec d'autres interleukines, tels que l'IL-3, l'IL-6 et l'IL-7 sur les progéniteurs lymphoïdes. En l'absence de *FL* chez la souris, il existe non seulement une diminution des progéniteurs myéloïdes mais aussi une diminution des progéniteurs lymphoïdes B, des cellules dendritiques,¹²² et des cellules NK.¹²³

2. Rôle du FLT3 dans les LAM

Le cluster de différenciation CD135 (ou FLT3) est surexprimé dans la majorité des cas de LAM quand on compare cette expression à des progéniteurs de donneurs sains,¹²⁴ mais aussi dans une grande partie des Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (LAL).¹²⁵ Son caractère pro-prolifératif sur les blastes a été corrélé à celui observé sur des progéniteurs hématopoïétiques normaux, avec un effet synergique en association avec les cytokines et facteurs de croissance G-CSF, GM-CSF, IL-3 et SCF.¹²⁶ Si les niveaux d'expression du récepteur ont parfois été corrélés aux taux de RC, de rechute et de survie des patients atteints de LAM, le rôle clé du *FLT3* dans la leucémogénèse repose, surtout, sur ses mutations.

a. Les mutations de type FLT3-ITD

i. Evènement génétique

Décrites en 1996 par Nakao *et al.*,³⁷ les FLT3-ITD sont, dans la plupart des cas, des séquences issues de l'intron 11, parfois de la séquence [intron 11 - exon 12] du FLT3. Ces évènements génétiques conservent toujours un cadre ouvert de lecture et associent le plus souvent des séquences étrangères. Dans l'étude de Schnittger *et al.* portant sur une large cohorte de LAM, des insertions allant de 3 à 400 pb ont été décrites, avec des niveaux de transcription de chaque allèle, sauvage et mutant, similaires.¹²⁷ La mutation de type FLT3-ITD a initialement été trouvée au sein de l'exon 14, au niveau de la partie JMD de la protéine. Il s'avèrera que ce site d'insertion concerne uniquement 70% des patients. Un second type d'insertion a été décrit en 2009, au sein de l'exon 15, correspondant à la partie TKD1 de la protéine et concernant 30% des patients (Figure 5).¹²⁸ Dans une grande cohorte de l'*AML Study Group*, Kayser *et al.* ont étudié 241 patients atteints de LAM FLT3-ITD. Environ 14% avaient plusieurs ITD (de 2 à 4) et la taille médiane de l'insertion était de 48 nucléotides (de 15 à 180). Plus l'insertion s'éloignait de l'extrémité 5'-N-terminale de la protéine, plus la taille de l'ITD était importante.¹¹⁵

ii. Conséquences conformationnelles

Sur le plan conformationnel, les mutations de type ITD au sein du récepteur FLT3 permettent une dimérisation ligand-indépendante. Néanmoins, la présence de FL, en plus de la mutation, induit une pleine activation du récepteur.¹²⁹

Le JMD est un régulateur négatif de l'activation du récepteur qui ne se déplie que lorsque le ligand est présent. Dans le cas d'une mutation de type ITD, l'encombrement stérique qui prévient les dimérisations ligand-indépendantes disparaît et des dimérisations se produisent. Ces dernières permettent un changement conformationnel qui entraîne la phosphorylation des résidus tyrosines des TKD.¹¹⁴ Par ailleurs, il a été démontré que les mutations de type FLT3-ITD induisaient une forte activation de STAT5 grâce à la paire de tyrosines Y₅₈₉ et Y₅₉₁ du JMD. Cette activation de STAT5 est résistante à l'activité de SOCS1, régulateur négatif de l'activation de STAT5 dans un contexte JAK2-dépendant.¹³⁰

Enfin, si le FLT3-WT n'active ses voies d'aval qu'après fixation de son ligand, de la surface cellulaire, il a été démontré que les récepteurs FLT3-ITD pouvaient non seulement signaler à partir de cette membrane plasmique, mais aussi et surtout, du secteur intra-cellulaire. Le récepteur, dans le cadre de cette localisation, n'active que peu les voies PI3K/AKT et MAPK,¹³¹ alors que STAT5 est fortement activé.¹³²

iii. Conséquences sur la signalisation

L'activation ligand-indépendante du FLT3-ITD induit une prolifération et un certain degré de blocage de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques. Si les voies des MAPK et PI3K/AKT restent importantes, un acteur clé apparaît : STAT5. Ce dernier, codé par les gènes *STAT5A* et *STAT5B*, est un régulateur pivot de l'hématopoïèse normale, classiquement en aval d'une large variété de récepteurs aux cytokines ou aux facteurs de croissance (Figure 7).

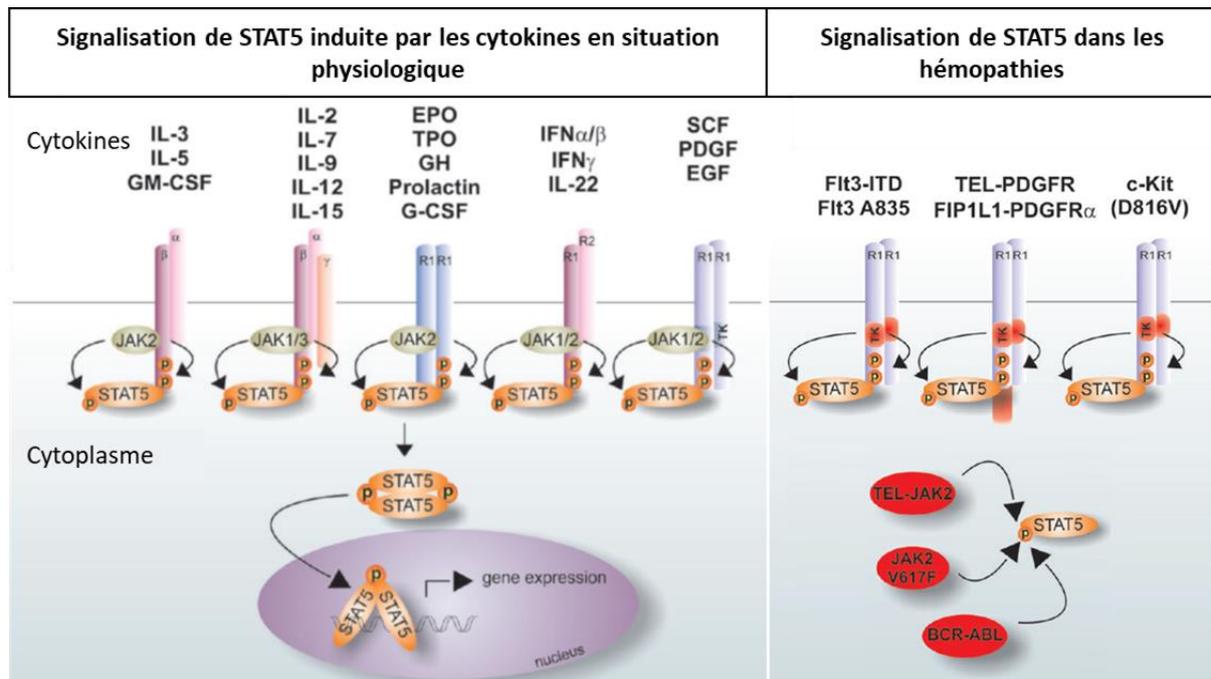


Figure 7 : Signalisation entraînant une activation de STAT5 dans l'hématopoïèse normale et leucémique, d'après Schepers *et al.* JAK-STAT 2012.¹³³

Ces cytokines et facteurs de croissance incluent (i) la famille des récepteurs « type IL-3 » (IL-3, -5 et GM-CSF), (ii) la famille des récepteurs « γ chain » (IL-2, -7, -9, -12, -15), (iii) la famille des récepteurs « single chain » (EPO, TPO, GH, Prolactine, G-CSF), (iv) la famille des récepteurs de classe II (IFN $\alpha/\beta/\gamma$ et IL-22) et enfin (v) la famille des RTK (SCF, PDGF et EGF). La plupart du temps, les TK JAK sont un intermédiaire entre le récepteur et la phosphorylation de STAT5. Les conséquences de cette activation sont hautement spécifiques de la lignée cellulaire dans laquelle elle se produit, pouvant aboutir à des mécanismes de prolifération, de différenciation, de survie ou de quiescence.¹³³

Dans le cadre des LAM FLT3-ITD, l'activation de STAT5 est JAK-indépendante. Sa phosphorylation passerait par SRC qui se fixerait par son domaine SH2 sur les tyrosines Y₅₈₉ et Y₅₉₁ du FLT3-ITD.¹³⁴ Certaines équipes ont suggéré un rôle de LYN,¹²⁰ d'autres enfin, ont démontré une activation indirecte, passant par la voie FAK/TIAM1/PAK1.¹³⁵

En aval de son activation, STAT5 induit une augmentation de RAC1, puis de l'activité des NADPH oxydases. Ces dernières entraînent une augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (O₂) et des cassures double-brins,¹³⁶ avec des conséquences caryotypiques.¹³⁷ STAT5 est, par ailleurs, connu pour induire la transcription de gènes cibles tels que des régulateurs du cycle cellulaire, CCND1 et CDC25A,¹³⁸ l'oncogène MYC,^{132,139} l'oncostatine M,¹⁴⁰ mais aussi et surtout les PIM serine/threonine kinases,^{132,141} notamment PIM1, impliquée dans la croissance et la survie cellulaire.¹⁴² Ce point sera détaillé dans le chapitre I.D.3.c. « Les mécanismes de résistance aux FLT3-ITK ».

Au-delà de STAT5, les mutations FLT3-ITD induisent une activation soutenue et dérégulée des voies MAPK et PI3K/AKT avec de nombreuses conséquences pro-oncogéniques. Indirectement, le RTK muté phosphoryle la threonine T₃₂ du FOXO3, empêchant son rôle clé dans la promotion de l'apoptose. Enfin, le FLT3-ITD active fortement ERK, qui va lui-même phosphoryler la serine S₂₁ de CEBP α , bloquant sa fonction et donc la différenciation cellulaire. Un mécanisme similaire se produit avec un autre facteur de transcription, PU.1.

iv. Prévalence dans les LAM

La mutation FLT3-ITD est présente dans 15 à 20% des cas de LAM de l'enfant,¹⁴³ et 20 à 25% des cas de LAM de l'adulte,⁵² avec un pic d'incidence entre 45 et 60 ans.⁴⁷ Dans les LAM de risque cytogénétique favorable, sa prévalence est de 6% des LAM t(8;21) et 5% des LAM inv(16)/t(16;16), sans valeur pronostique particulière.¹⁴⁴ Sa prévalence est de 20 à 30% dans les LAM t(15;17) dans lesquelles sa valeur pronostique est discutée.^{145,146} Dans les LAM à caryotypes normaux, sa prévalence est de 32% chez les sujets jeunes, associée à des taux de rechute de plus de 60% à 5 ans et une survie globale de l'ordre de 20% à 5 ans en l'absence de stratégie thérapeutique incluant une greffe de CSH allogéniques.⁴⁰ Dans les LAM de pronostic défavorable, les mutations de type FLT3-ITD sont retrouvées dans 8% des cas,¹⁴⁷ et accessoirement dans 80% des cas de LAM avec t(6;9)(p23;q34).⁵² Les FLT3-ITD sont rares dans les SMD et les Leucémies Myélomonocytaires Chroniques, de l'ordre de 1% à 4%, probablement de mauvais pronostic et associées à des transformations rapides même si la faiblesse des effectifs empêche de conclure formellement.¹⁴⁸ Enfin, la prévalence des FLT3-ITD est respectivement de 15% et 11% dans les LAM secondaires et radio- ou chimio-induites.¹²⁷ Elles sont, par ailleurs, souvent associées à un génotype *DNMT3A* et *NPM1* mutés.¹⁴⁹ On les retrouve aussi dans les LAM à cytogénétique complexe et associées à un génotype *TP53* muté.⁵³ Les mutations FLT3-ITD n'existent pas dans les tumeurs solides et ne sont jamais retrouvées dans des hématopoïèses clonales type CHIP. Sur le plan cytologique, elles sont généralement associées aux LAM sans maturation, avec maturation et myélomonocytaires de la classification FAB, et à des leucocytoses sanguines et blastoses médullaires élevées.¹²⁷

v. Valeur pronostique

Si la valeur pronostique des mutations FLT3-ITD est indiscutable dans les LAM à caryotype de pronostic intermédiaire, elle peut être affinée en fonction de nombreux paramètres. La longueur de l'ITD est associée à une diminution des taux de RC à l'issue de la chimiothérapie d'induction.¹¹⁵ Les patients atteints de LAM avec une ITD dans le TKD1 ont des durées de survie sans rechute et de survie globale plus courtes,¹⁵⁰ plus particulièrement lorsque l'ITD se situe dans le $\beta 1$ -sheet.¹¹⁵ Enfin, le ratio allélique ITD/WT est un facteur pronostique important. Il représente la quantité

d'allèles FLT3-ITD par rapport à la quantité d'allèles FLT3-WT. Néanmoins, les LOH_{13q}, fréquentes à la rechute mais possibles au diagnostic, font artificiellement monter ce ratio sans que cela soit un reflet direct d'une quantité de cellules porteuses de la mutation. Quoi qu'il en soit, plus il est élevé, moins le pronostic est bon, en termes de survie sans rechute ou de survie globale. Plusieurs seuils ont été utilisés, des plus bas 0,3¹⁵¹ 0,5^{150,152} aux plus élevés 0,78.¹⁵³ Le seuil de 0,5 a permis de démontrer que chez les patients présentant une mutation de *NPM1*, ceux qui présentent en plus une mutation de type FLT3-ITD avec un ratio ITD/WT < 0,5 ont le même pronostic que les patients FLT3-WT et que le bénéfice de la greffe de CSH allogéniques en termes de survie globale disparaissait.¹⁵² D'autres études ont retrouvé des résultats similaires mais sans se limiter aux LAM mutées sur *NPM1*.¹⁵⁰ Les ratio alléliques élevés ont par ailleurs été directement associés à une diminution de la réponse initiale à la chimiothérapie.¹⁵⁰

vi. Arbre phylogénétique

Les mutations de type FLT3-ITD sont tardives dans la leucémogénèse,⁹⁷ donc sous-clonales au diagnostic. Ces sous-clones peuvent évoluer en subissant une perte de leur allèle sauvage par un évènement génétique de type LOH_{13q}. L'évènement est tardif et n'est jamais observé dans les clones FLT3-WT.¹⁵⁴ De plus, dès le diagnostic, plusieurs clones porteurs de différentes ITD peuvent être retrouvés.

S. Schnittger, en 2002,¹²⁷ a suggéré une forte prévalence des mutations de type FLT3-ITD à la rechute, associées à des LOH_{13q} et à des modifications caryotypiques supplémentaires. Cette pénétrance à la rechute a longtemps été discutée, systématique dans l'étude allemande initiale ou d'autres études,^{127,155} la mutation est en fait perdue dans 10%,¹⁵⁶ à 25% des cas.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Parallèlement, il a été démontré que ces clones FLT3-ITD de rechute, dépendants de leur oncogène, étaient sélectionnés par la chimiothérapie conventionnelle, et que cette addiction pouvait se traduire par une plus grande sensibilité aux FLT3-ITK que les clones FLT3-ITD du diagnostic.¹⁶⁰

Par ailleurs, le paysage moléculaire des LAM FLT3-ITD en rechute semble particulier. En dehors des mutations de *DNMT3A* et de *NPM1*, auxquelles la mutation est associée dès le diagnostic et qui sont très stables à la rechute, des mutations de *MLL3* (15%) et *FAT1* (10%) sont particulièrement fréquentes.¹⁵⁶ Enfin, jusqu'à 20%

des patients FLT3-WT au diagnostic peuvent acquérir une mutation de type ITD à la rechute.¹⁵⁷

b. Les mutations ponctuelles du FLT3

Les plus fréquentes des mutations ponctuelles se situent au sein de la région « activation-loop » du TKD2. Ces mutations de type FLT3-TKD induisent aussi une activation constitutive du récepteur. La plus fréquente est, de très loin, la mutation D835 décrite en 2000.¹⁶¹ D'autres, moins fréquentes, ont été retrouvées en position I836,¹⁵³ 840GS,¹⁶² N841,¹⁶³ et Y842.¹⁶⁴ La différence pronostique observée reste mal expliquée par les différences de signalisation. La prévalence des mutations de type FLT3-TKD est de l'ordre de 7% à 9% selon les séries,^{49,52,53} légèrement plus élevée, à 12%, dans les caryotypes normaux,⁴⁰ et dans le sous-groupe des LAM de type CBF présentant une inv(16)/t(16;16) dans laquelle sa prévalence est de 15% sans toutefois avoir une valeur pronostique particulière.^{52,144}

Dans la publication de Papaemmanuil *et al.*, les effectifs de l'étude et le degré de couverture des gènes étudiés ont permis de mettre en évidence une interaction entre les mutations FLT3-TKD et les mutations de type « partial tandem duplication » de MLL ou « MLL-PTD ». Le pronostic des patients était très défavorable (10% de survie globale à 2 ans) lorsque les deux mutations étaient présentes, bon lorsque la FLT3-TKD était présente sans MLL-PTD (65% de survie globale à 5 ans) et intermédiaire dans les autres cas (50% de survie globale à 5 ans). La valeur pronostique des FLT3-TKD reste discutée et elle est par ailleurs très stable à la rechute.¹⁵⁹ Ces mutations ponctuelles préexistantes à tout traitement sont quasiment exclusives des mutations FLT3-ITD, puisque les co-occurrences au diagnostic sont de l'ordre de 2%. Inversement, ces mutations sont fréquemment retrouvées, ensemble, après exposition à certains FLT3-ITK, tels que le quizartinib, dans chacun des allèles ITD et WT. Ce point sera discuté dans le chapitre I.D.3.c. « Les mécanismes de résistance aux FLT3-ITK ».

Enfin, de rares mutations ponctuelles dans le JMD, concernant 2% des patients atteints de LAM, ont été décrites. Elles siègent dans le site habituel des ITD avec des conséquences biochimiques et fonctionnelles similaires, entraînant des modifications

de la conformation auto-inhibitrice du JMD, une dimérisation ligand-indépendante et une activation constitutive de l'activité kinase du récepteur.¹⁶⁵

3. Inhibiteurs de tyrosine kinase dans les LAM FLT3 mutées

La démarche oncothéranostique a permis l'obtention de résultats révolutionnaires en Hématologie, dans la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) bien entendu mais aussi dans les LAL Phi⁺ ou encore dans les LAM3. Cependant, dans son édito introduisant le fameux « Achilles Heal of cancer », basé sur la notion d'addiction de la cellule cancéreuse à son oncogène, I.B. Weinstein évoquait déjà le fait que l'identification d'une cible « critique » ne suffirait pas. La compréhension du cancer de manière plus dynamique serait nécessaire, impliquant des combinaisons de thérapies sans quoi l'émergence de clones résistants serait inévitable.¹⁶⁶ Si ce phénomène est relativement marginal dans la LMC,¹⁶⁷ pathologie clairement sous la dépendance d'un seul oncogène, il s'avèrera terriblement vrai dans d'autres modèles de néoplasies, incluant les LAM FLT3-ITD, malgré une hétérogénéité clonale moindre par rapport aux autres cancers. Les notions d'oncothéranostic et de thérapie ciblée auront ainsi rapidement montré leurs limites. L'utilisation des FLT3-ITK restera probablement indispensable à l'avenir, mais seulement en complément d'autres stratégies thérapeutiques.

a. Pertinence du ciblage thérapeutique des anomalies de type FLT3-ITD

Le caractère « driver » des mutations de type FLT3-ITD a longtemps été débattu car ces mutations ne sont jamais isolées chez l'Homme et que le génotype FLT3-ITD seul, dans des modèles murins, produit un phénotype de SMP. Néanmoins, ce débat est principalement sémantique : la mutation de type FLT3-ITD peut ne pas être considérée conductrice car elle ne donne pas de LAM lorsqu'elle est isolée, elle n'est pas pour autant simple « passager ».

Bien que tardives dans la leucémogénèse, ces mutations confèrent une addiction à la cellule cancéreuse puisque cette dernière enclenche un mécanisme de LOH_{13q} pour perdre son allèle sauvage,¹⁵⁴ et qu'elle développe des mutations de résistance spécifiques aux FLT3-ITK telles que celles observées dans la LMC.¹⁶⁸ Elles sont, de plus, particulièrement résistantes à la chimiothérapie conventionnelle car présentes à la rechute dans 75 à 90% des cas. Cette probabilité augmente avec le

ratio ITD/WT du diagnostic, donc avec la proportion de cellules mutées. La cible thérapeutique reste pertinente, même si elle n'est pas absolue. Si on se situe dans un modèle classique d'acquisition sériée de mutations, *DNMT3A* puis *NPM1* puis *FLT3*, il est vraisemblable que ces FLT3-ITK n'auront pas d'effet, théoriquement, sur les clones *DNMT3A* mutés, *NPM1* mutés et FLT3-WT.

Des études suggèrent que le FLT3 n'est pas exprimé dans les CSH normales. Il est inutile pour leur prolifération ou leur maintenance mais néanmoins indispensable pour la transition entre CSH et progéniteur multipotent, en conditions d'homéostasie ou de stress cellulaire.¹⁶⁹ En 2012, Chu *et al.* ont démontré que les CSH FLT3-ITD présentait un désavantage de prise de greffe chez la souris du fait de leur prolifération qui épuisait le stock de cellules aux propriétés « stemness ». Ces données suggéraient un rôle du récepteur, donc une expression du FLT3-ITD dans la CSH.¹⁷⁰ Récemment, Mead *et al.* ont démontré par une analyse en « Single cell analysis » que les CSH n'exprimaient pas d'ARN de FLT3 et que le profil transcriptionnel « stemness » était inversement corrélé à la présence de cet ARN. Ces résultats, associés à des expérimentations sur modèle murin, démontraient que les CSH « knock-in » pour le FLT3-ITD n'exprimaient pas le récepteur, que la transcription se produisait dans des cellules transitionnelles entre CSH et progéniteur multipotent et que ce progéniteur lui-même présentait une expression phénotypique du FLT3-ITD. A l'issue, ces cellules exerçaient un effet toxique sur les cellules de la niche hématopoïétique, TNF α -dépendant, diminuant sa capacité à soutenir l'hématopoïèse.¹⁷¹

In fine, M. Levis publiera un éditorial commentant ces résultats et suggérant que si les LIC FLT3-ITD n'expriment pas la protéine correspondante, elles ne sont pas dépendantes de sa signalisation. Leur élimination devra donc se faire grâce à des associations avec des traitements permettant d'atteindre cette fraction de cellules leucémiques qui ne sont pas sous la dépendance majoritaire de cet oncogène.¹⁷²

Dans un autre modèle kinase-dépendant, la LMC, le risque de rechute à l'arrêt du traitement diminue avec la durée d'exposition à l'imatinib avant arrêt du traitement.¹⁷³ L'hypothèse est que cette diminution du risque de rechute serait due au fait que les LIC Phi⁺, en rentrant en cycle deviendraient sensibles aux ITK, la durée d'exposition permettant d'atteindre ces cellules qui se divisent à intervalle au moins

annuel. Ce raisonnement pourrait s'appliquer aux LAM FLT3-ITD et à leur inhibition, et serait un argument en faveur du traitement de maintenance chez ces patients.

b. Les différentes classes d'inhibiteurs de tyrosine kinase

Les FLT3-ITK sont des composés hétérocycliques, inhibant le FLT3 par compétition avec l'ATP dans la poche du TKD2. Cette compétition inhibe l'autophosphorylation du récepteur ligand-indépendante et donc la phosphorylation des substrats et donc des voies de signalisation en aval. La première génération d'inhibiteurs comprend principalement des inhibiteurs multi-kinase utilisés initialement dans les tumeurs solides tels que le midostaurin, le lestaurtinib, le sorafenib et le sunitinib. La seconde génération comprend le quizartinib, le crenolanib, le gilteritinib et accessoirement le ponatinib (Tableau 4).

Les FLT3-ITK peuvent être classés en deux catégories fonctionnelles selon deux conformations de la kinase du FLT3 en lien avec la position des acides aminés Asp(D)-Phe(F)-Gly(G) qui sont à la base de l'« activation-loop ». Dans la position « DFG-in », l'« activation-loop » est dépliée, la poche à ATP est accessible, la kinase est active. Dans la position « DFG-out », l'« activation-loop » est repliée sur la poche à ATP, les acides aminés en position D835 et Y842 stabilisent la conformation repliée, inactive, en créant respectivement des liaisons hydrogènes avec les acides aminés S838 et D811.

→ Les FLT3-ITK de « type I » ciblent les conformations « DFG-in » et « DFG-out » du récepteur. Cette famille comporte le crenolanib, le midostaurin, le sunitinib, le lestaurtinib, le gilteritinib, indifféremment de première ou de deuxième génération. Ils sont, en règle générale, efficaces dans les LAM avec mutation de type FLT3-ITD et -TKD.

→ Les FLT3-ITK de « type II » ciblent la conformation « DFG-out » inactive du récepteur. Cette famille comporte le quizartinib, le sorafenib, le ponatinib, le pexidartinib, indifféremment de première ou deuxième génération. Une mutation TKD sur les résidus D835 ou Y842 empêche les liaisons hydrogènes avec les S838 et D811, la conformation repliée n'est pas stable, elle se rapproche d'une conformation « active » et les FLT3-ITK de type II ne sont plus efficaces.

Tableau 4 : Différents types d'inhibiteurs de tyrosine kinase utilisés dans les LAM FLT3-ITD, leurs cibles et les mutations de résistance

DCI (code)	Type	Cibles	Mutations de résistance
Première génération			
Sunitinib (SU11248)	I	FLT3, CSF, VEGFR	
Midostaurin (PKC412)	I	PDGFRB, FLT3, KIT	N676K, ¹⁷⁴
Lestaurtinib (CEP701)	I	FLT3, JAK2	
Sorafenib (BAY-43-9006)	II	FLT3, VEGFR, KIT	D835Y/H, ¹⁷⁵ F691L, ¹⁷⁶
Deuxième génération			
Quizartinib (AC220)	II	FLT3, KIT, PDGFR	F691L, ¹⁶⁸ D835Y/V/F, ¹⁶⁸ Y842C/H, ¹⁶⁸
Crenolanib (CP868-596)	I	PDGFR, FLT3, ULK2	F691L, ¹⁷⁷⁻¹⁷⁹
Gilteritinib (ASP2215)	I	FLT3, LTK, AXL	
Ponatinib (AP24534)	II	BCR-ABL, SRC, FLT3	
Pexidartinib (PLX3397)	II	CSFR1, KIT, FLT3	D835Y/H/V/E, ¹⁸⁰ N609K, ¹⁸⁰ T628I, ¹⁸⁰ N676K/T, ¹⁸⁰ S652G, ¹⁸⁰ E708G, T820A ¹⁸⁰

i. Les FLT3-ITK de première génération

Le sunitinib, inhibiteur multi-kinase de type I, a initialement été approuvé dans les cancers du rein métastatiques et les tumeurs stromales gastro-intestinales. Une première étude de phase 1 dans les LAM a démontré que la dose nécessaire à une inhibition correcte du FLT3 était de l'ordre de 200 mg/jour,¹⁸¹ alors que la seconde démontrait que la dose maximale tolérée était de 75 mg/jour.¹⁸² Une phase 1/2 a finalement démontré que la dose de 25 mg en association à de la chimiothérapie intensive déclenchait des toxicités majeures suggérant que le sunitinib a terminé son développement dans cette indication.¹⁸³

Le midostaurin est un inhibiteur multi-kinase de type I,¹⁸⁴ dérivé de la staurosporine, premier inhibiteur pan-kinase, initialement développé comme inhibiteur de la PKC.¹⁸⁵ A la même période, les mutations FLT3-ITD étaient découvertes et le midostaurin permettait un bon degré d'inhibition.¹⁸⁶ Dans un premier essai de phase 1, Stone *et al.* ont montré des clairances blastiques périphériques et médullaires chez 50% des patients.¹⁸⁷ La phase 2b a randomisé 95 patients atteints de LAM FLT3 mutés ou WT et a confirmé une clairance blastique supérieure à 50% chez 71% et 42% des patients, respectivement. Aucune réponse complète n'a été observée et la clairance médullaire était toujours nettement inférieure à la clairance périphérique, suggérant une réponse différentielle entre moelle osseuse et sang, chez les malades mutés et WT.¹⁸⁸ Finalement, sa faisabilité, en association avec de la chimiothérapie intensive, sera démontrée à la dose de 50 mg x 2/jour,¹⁸⁹ et l'essai RATIFY du *Cancer and Leukemia Group B* démontrera son efficacité en association avec la chimiothérapie.¹⁹⁰ Ce protocole était un essai randomisé de phase 3 dans lequel 717 patients atteints de LAM FLT3-ITD ou FLT3-TKD recevaient une chimiothérapie conventionnelle de type « 3+7 » suivie de consolidations à base de fortes doses d'aracytine, associées ou non à du midostaurin, suivi d'un an de maintenance. La combinaison permettait une survie globale à 4 ans de 51,4% contre 44,3%, et un prolongement de la survie médiane de 25,6 à 74,5 mois avec le midostaurin. Ces résultats ont permis son approbation par la « Food and Drug Administration » le 28 avril 2017 (RYDAPT®, Novartis Pharmaceuticals, Inc.) pour le traitement des LAM FLT3 mutées de l'adulte, à la posologie de 50 mg x 2/jour de J8 à J21 de chaque cycle de chimiothérapie, suivie d'un an d'entretien en monothérapie.

Le lestaurtinib est un inhibiteur multi-kinase de type I qui semblait prometteur car efficace sur les blastes FLT3-ITD et WT *in vitro*,¹⁹¹ et dans une cohorte de phase 2.¹⁹² Néanmoins, un essai clinique de phase 3 a récemment randomisé 500 patients présentant une mutation de type FLT3-ITD (75%), FLT3-TKD (23%) ou les deux (2%). Les deux bras comportaient une chimiothérapie intensive avec consolidations répétées, avec ou sans lestaurtinib entre les chimiothérapies. Aucune différence en termes de réponse à la chimiothérapie d'induction, de survie sans rechute ou de survie globale n'a été mise en évidence en dehors d'analyses en sous-groupes.¹⁹³

Le sorafenib est un inhibiteur multi-kinase de type II, initialement approuvé dans le cancer du rein et le carcinome hépato-cellulaire. Deux essais de phase 1 ont démontré que la dose maximale tolérée de 400 mg x 2/jour de J1 à J28 permettait une bonne inhibition du FLT3. Son efficacité était dépendante du statut FLT3-ITD.^{194,195} L'essai SORAML, second essai de phase 2, a inclus 272 patients atteints de LAM FLT3-ITD et WT recevant une chimiothérapie conventionnelle de type « 3+7 » associée ou non à du sorafenib. La combinaison permettait une survie sans événement de 40% à 3 ans contre 22% dans le bras chimiothérapie seule. Néanmoins, le statut FLT3-ITD ou FLT3-WT ne semblait pas modifier drastiquement l'effet du traitement, même si la survie globale semblait prolongée avec le sorafenib dans le sous-groupe FLT3-ITD.¹⁹⁶ Les résultats les plus intéressants avec le sorafenib ont été publiés dans le contexte des rechutes post-allogreffe. Les premiers sont issus d'une étude rétrospective ayant inclus 65 patients en rechute ou réfractaires qui avaient reçu du sorafenib en monothérapie dont 29 en situation de rechute post-allogreffe. Ces derniers ont développé moins de résistance et de manière plus tardive que ceux traités en situation de rechute sans allogreffe préalable.¹⁹⁷ Un essai de phase 1 a donc testé le médicament en maintenance post-allogreffe dans les LAM FLT3-ITD : la survie sans maladie et la survie globale à 1 an étaient respectivement de 85 et 95% démontrant non seulement sa faisabilité mais aussi des résultats encourageants sur cette petite cohorte de 22 patients,¹⁹⁸ avec des résultats proches de ceux obtenus dans une cohorte rétrospective de 81 patients.¹⁹⁹

ii. Les FLT3-ITK de deuxième génération

Le quizartinib est un FLT3-ITK de type II, se fixant dans une conformation « DFG-out » du RTK.²⁰⁰ Il fût le premier ITK développé spécifiquement comme inhibiteur du FLT3, avec une efficacité particulière sur les mutants de type FLT3-ITD. Validé sur des lignées *in vitro*, sur des blastes *ex vivo* puis *in vivo* dans des modèles murins,²⁰¹ il a rapidement été testé chez l'Homme. La phase 1 a déterminé une dose maximale tolérée à 200 mg/jour, associée à des allongements asymptomatiques du QT (intervalle entre le début de l'onde Q et la fin de l'onde T sur un électrocardiogramme), des anémies et des thrombopénies.²⁰² Cette posologie a été reconduite dans 5 études de phase 2 dont 4 ont été présentées en congrès. La première a nécessité de diminuer la dose utilisée de 200 à 90-135 mg/jour,²⁰³ puis la deuxième a inclus 133 patients > 60 ans dont 70% présentaient une mutation FLT3-ITD. Les taux de réponse globale (RC+RC avec cytopénie et rémissions partielles) étaient respectivement de 32% et 54% pour les patients FLT3-WT et FLT3-ITD.²⁰⁴ Une troisième phase 2 a inclus 137 patients < 60 ans dont 72% présentaient une LAM FLT3-ITD en rechute ou réfractaire, les taux de réponse étaient similaires à la cohorte précédente mais cet essai fut l'occasion de montrer que le quizartinib permettait d'obtenir un degré de rémission suffisant pour permettre une procédure de greffe de CSH allogéniques chez les sujets jeunes. Dans tous les cas, la RC avec cytopénie était la réponse la plus fréquemment observée, probablement du fait d'une inhibition de KIT.²⁰⁵ Des doses plus faibles ont été utilisées dans une quatrième phase 2, allant de 30 à 60 mg/jour et semblaient donner des niveaux de réponse globale similaires, de l'ordre de 50%.²⁰⁶ Devant ces taux de réponse élevés, en monothérapie chez des patients FLT3-ITD en situation de rechute ou réfractaires, des essais en association à la chimiothérapie ont été débutés. Plusieurs sont en cours, en association avec une induction de type « 3+7 » (NCT01390337), suivi d'une maintenance incluant la période post-transplantation (NCT02668653 – QuANTUM-First), en entretien post greffe (NCT01468467), avec azacitidine ou aracytine faible dose (NCT01892371), en rechute *versus* rattrapage (NCT02039726). Il n'y a pas, à notre connaissance, de données communiquées sur ces essais.

In fine, la réponse typique observée avec le quizartinib consiste en une clairance des blastes périphériques, associée à la persistance d'un infiltrat médullaire dont les cellules FLT3-ITD présentent des stigmates de différenciation myéloïde.²⁰⁷

Cette diminution de l'efficacité du quizartinib serait due à un maintien de l'activation de MAPK par les cytokines du microenvironnement.²⁰⁸ Des hyperleucocytoses transitoires, associées à quelques syndromes de différenciation ont été observées. A l'issue, la moelle osseuse reste généralement hypocellulaire, probablement du fait de l'inhibition de KIT. Deux types de résistances sont observés : primaires, elles sont généralement dues à des mécanismes extrinsèques ; secondaires, elles sont dues à des mécanismes intrinsèques, au premier rang : les mutations de type D835. Ces différents points seront développés dans les chapitres I.D.3.c « Les mécanismes de résistance intrinsèques à la cellule leucémique » et II.B.3 « Rôle protecteur et mécanismes de résistance extrinsèques ».

Le crenolanib est un FLT3-ITK de type I potentiellement actif dans les LAM FLT3-ITD et FLT3-TKD. Son principal avantage est l'absence d'inhibition de KIT qui laisse penser que son profil d'hématotoxicité sera plus favorable. Il est efficace sur les mutations de type FLT3-ITD et FLT3-TKD type D835 et Y842.¹⁷⁷ Il semble être actif sur les mutations N676K résistantes au midostaurin,¹⁷⁴ mais aussi présentes au diagnostic chez 6% des patients atteints de LAM avec inv(16), sans valeur pronostique particulière.²⁰⁹ Une étude de phase 2, présentée au congrès 2014 de l'ASH a randomisé 34 patients FLT3-ITD ou FLT3-TKD dont > 60% avaient déjà reçu un FLT3-ITK. Les taux de réponse, de survie globale et de survie sans évènement étaient supérieurs chez les patients naïfs de tout traitement par FLT3-ITK.²¹⁰

Le gilteritinib est un FLT3-ITK de type I efficace sur les différentes mutations du FLT3, ITD et TKD, incluant les mutations « gatekeeper » type F691L, *in vitro*.²¹¹ De plus, ce FLT3-ITK est un puissant inhibiteur d'AXL, RTK impliqué dans la résistance aux chimiothérapies conventionnelles et aux ITK dans de nombreux modèles de cancers. Ces différents points seront détaillés dans le chapitre III.B. « Fonctions physiopathologiques des RTAM en Oncologie ». De plus, sa faible inhibition de KIT laisse supposer une meilleure tolérance hématologique que le quizartinib.¹⁷⁹ Ce FLT3-ITK est actuellement en test dans 11 essais cliniques enregistrés dans ClinicalTrials. Les résultats définitifs de la phase 1/2 ont récemment été publiés dans le *Lancet Oncology*.²¹² Cet essai a inclus 252 patients, atteints de LAM en rechute ou réfractaires, dont 30% d'allogreffés et 25% de patients ayant déjà reçu un FLT3-ITK. Les ¾ des patients présentaient une mutation de FLT3, de type FLT3-ITD (82%), FLT3-TKD (7%) ou les deux (8%). Le taux de réponse globale (RC+RC avec cytopénie

et rémissions partielles) était de 49% pour les patients FLT3 mutés et 12% pour les patients FLT3-WT. Son efficacité est particulièrement importante chez les malades en rechute, caractérisés généralement par un ratio ITD/WT plus élevé et une plus grande dépendance à l'oncogène.¹⁶⁰ Il serait actif chez les patients ayant développé une mutation du TKD2 sous quizartinib. Ces points seront discutés dans le chapitre III.B.3.a « Inhibiteurs de tyrosine kinase anti-AXL ».

Le ponatinib est un FLT3-ITK de type 2, développé initialement pour cibler la mutation T315I du BCR-ABL.²¹³ Son efficacité dans les LAM FLT3-ITD a été démontrée *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins,²¹⁴ non seulement dans des modèles de LAM FLT3-ITD classiques mais aussi dans ceux portant des mutations « gatekeeper » telles que les F691,²¹⁵ ou d'autres mutations de résistance apparaissant sous traitement par quizartinib ou sorafenib.²¹⁶ Un essai clinique de phase 1/2 est actuellement ouvert en France, testant le ponatinib en association à la chimiothérapie de consolidation par aracytine à dose forte ou intermédiaire (NCT02428543).

D'autres inhibiteurs ont vu leur développement arrêté, tels que le KW-2449, en raison d'une demi-vie courte.²¹⁷ D'autres, enfin, sont à différentes phases de développement, pré-cliniques ou cliniques en phase précoce, tels que le tandutinib, le pexidartinib *etc.*

Finalement, la première génération de FLT3-ITK inclut des inhibiteurs multi-kinase issus de repositionnement de médicaments, avec de nombreux effets « off-target » (Figure 8). Ils restent intéressants mais manquent d'efficacité, même si les essais ont pu démontrer un bénéfice en phase 3 tels qu'avec le midostaurin. La deuxième génération d'inhibiteurs comprend, là aussi, des traitements « repositionnés » (crenolanib, inhibiteur de PDGFR et ponatinib, inhibiteur d'ABL). S'ils sont plus spécifiques du FLT3, ils sont aussi confrontés à des effets « off-target » et à des mutations de résistance type « activation-loop » et « gatekeeper ». Le quizartinib a été le premier ITK fabriqué sur mesure pour le FLT3, néanmoins, son hématotoxicité secondaire à son action sur KIT limitera peut-être son développement. Enfin, le gilteritinib pourrait cibler le FLT3 avec moins d'effets « off-target » tout en conservant une efficacité sur les mutations « gatekeeper ». De plus, il cible un autre RTK impliqué dans les résistances primaires aux ITK et aux chimiothérapies conventionnelles : AXL.

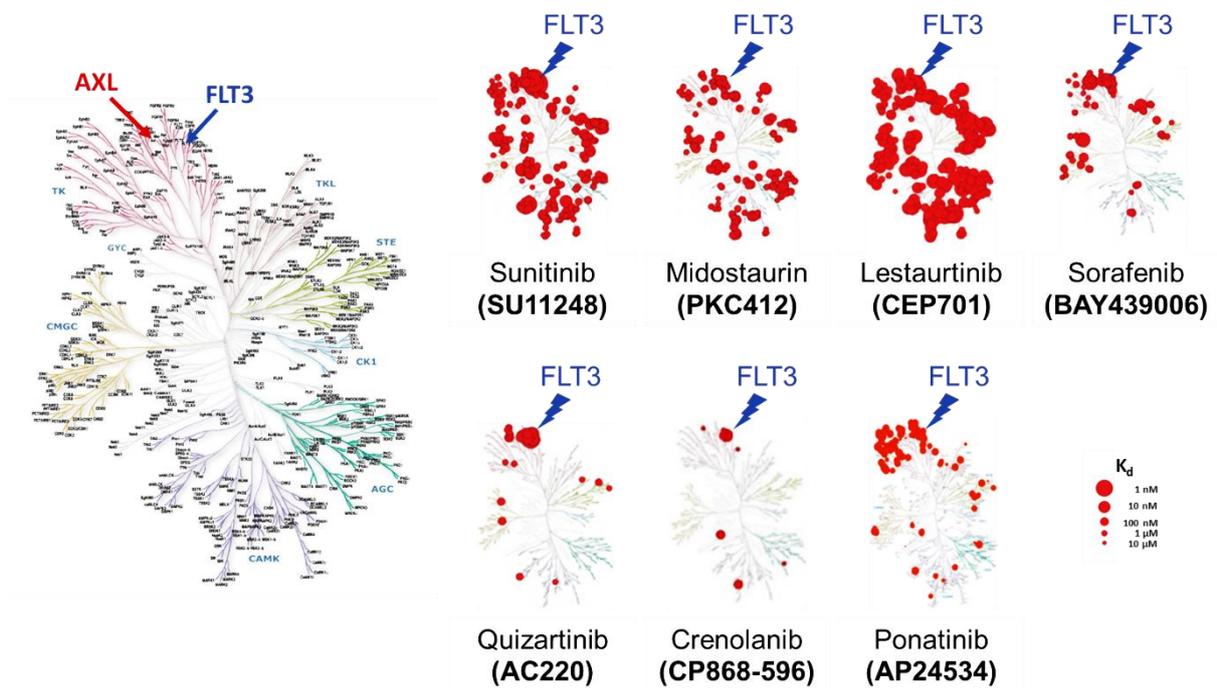


Figure 8 : Dendrogrammes des protéines kinases humaines avec localisation d'AXL, de FLT3, et niveau de spécificité des FLT3-ITK. Première génération (en haut) et seconde génération (en bas), les cercles rouges représentent la liaison aux kinases, leur taille est proportionnelle à leur affinité. D'après Zarrinkar *et al. Blood* 2009,²⁰¹ et Karaman *et al. Nature Biotech* 2008.¹⁸⁴

c. Les mécanismes de résistance aux FLT3-ITK

L'ensemble des essais cliniques présentés ci-dessus ont déjà permis de mettre en évidence des mécanismes de résistance, soit primaires chez les patients ne répondant pas d'emblée, soit secondaires chez des patients présentant une réponse initiale. Ces mécanismes de résistance peuvent être classés en deux catégories (Figure 9) :

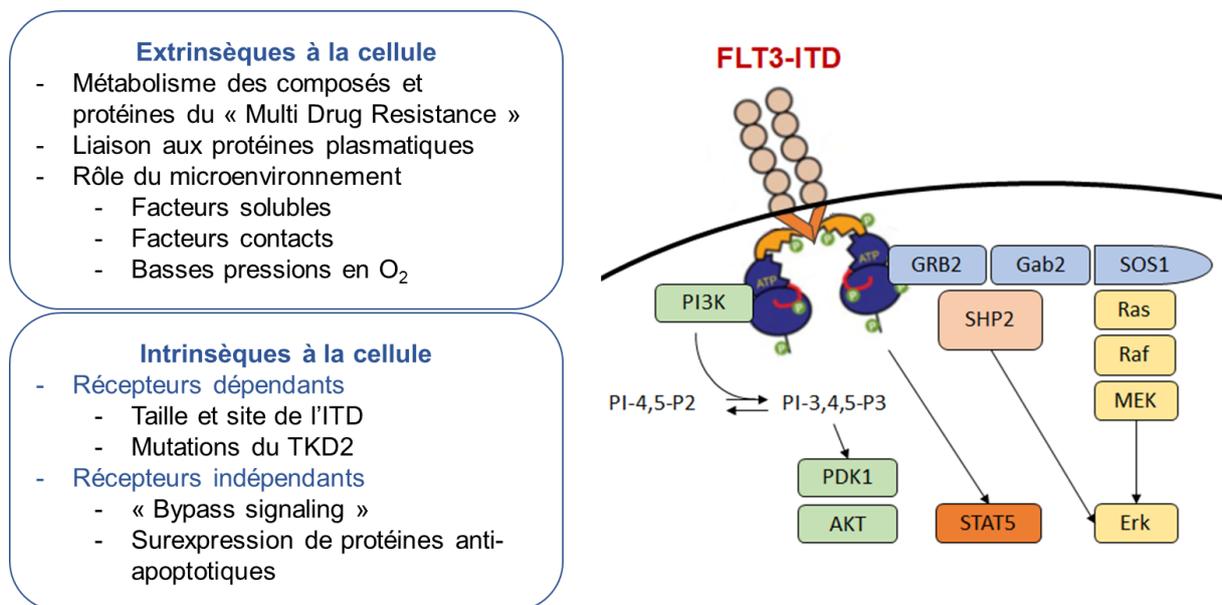


Figure 9 : Classification des mécanismes de résistance aux FLT3-ITK, intrinsèques ou extrinsèques à la cellule.

i. Extrinsèques à la cellule leucémique

Ces mécanismes peuvent être en lien avec le métabolisme de l'ITK, hépatique ou au niveau des protéines d'efflux, ou bien avec leur niveau de liaison avec les protéines plasmatiques. Ces deux premiers mécanismes ne seront pas détaillés. Le troisième correspond à une résistance induite par le microenvironnement, qui semble particulièrement importante dans le cadre des FLT3-ITK. En effet, la différence, parfois majeure, observée entre les clairances blastiques sanguine et médullaire suggère que ce mécanisme est prépondérant. Ce chapitre sera détaillé dans le chapitre II.B.3 « Rôle protecteur et mécanismes de résistance extrinsèques ».

ii. Intrinsèques à la cellule leucémique

Récepteurs dépendants

- Ils peuvent être en lien avec la taille et le site de l'ITD. En effet, si le site de l'ITD ne semble pas modifier les capacités clonales ou prolifératives des cellules de LAM *in vitro*, les cellules présentant une ITD au sein du TKD1 sont moins sensibles au quizartinib et au midostaurin. Parallèlement, *in vivo*, si les mutations FLT3-ITD au sein du TKD1 confèrent à la cellule leucémique un moindre degré de prise de greffe, elles semblent plus résistantes aux deux FLT3-ITK précités. Enfin, elles semblent aussi plus résistantes aux chimiothérapies conventionnelles.^{115,128} Dans ce cadre, le microenvironnement joue un rôle clé puisque certaines caractéristiques, absentes *in vitro*, sont dévoilées *in vivo*.²¹⁸

- Néanmoins, ces mécanismes de résistance intrinsèques à la cellule, dépendants du récepteur FLT3, sont surtout secondaires à l'émergence de clones présentant une mutation ponctuelle dans le TKD2. Initialement décrit dans la LMC, ce mécanisme de résistance a été rapporté pour la première fois dans une LAM FLT3-ITD chez un patient en rechute 3 mois après une bonne réponse au midostaurin, il s'agissait d'une mutation de type N676K, au sein de l'allèle FLT3-ITD.¹⁷⁴ Ces mutations ponctuelles sont de deux types :

Les premières sont dites de type « gatekeeper » et concernent des mutations sur des acides aminés directement impliqués dans la fixation de l'ITK sur le récepteur. Dans le cadre de la LMC, la mutation « gatekeeper » typique du BCR-ABL est la T315I ; dans le cadre des FLT3-ITD, il s'agit de la mutation F691L.¹⁸⁰ Cette mutation se produit au niveau d'un acide aminé de la poche à ATP qui contrôle l'accès de l'ITK à son site de fixation.

Les secondes sont dites de type « activation-loop » et déstabilisent la conformation inactive de la protéine. Cette conformation « non-inactive » empêche la fixation des ITK de type II (quizartinib, sorafenib, ponatinib, pexidartinib). Bien que de nombreux FLT3-ITK de type II de seconde génération soient en développement, il est probable que seuls des FLT3-ITK de classe I (crenolanib, midostaurin, sunitinib, lestaurtinib, gilteritinib) puisse inhiber ces mutations.

Si les mutations de type « gatekeeper » peuvent théoriquement rendre les LAM FLT3-ITD résistantes à tous types de FLT3-ITK, les secondes induisent une résistance aux FLT3-ITK de type II. En effet, le sorafenib, un FLT3-ITK de type II, a été rapporté comme sélectionnant des clones avec mutations de type D835Y/H,¹⁷⁵ et F691L.¹⁷⁶ Dans le cas du quizartinib, autre FLT3-ITK de type II, la moitié des patients résistants présentent au moins une mutation dans le TKD, de type F691L ou D835Y/V/F voire Y842C/H.¹⁶⁸ Les FLT3-ITK de type II sont donc exposés aux deux types de résistances ; intrinsèquement inefficaces sur les mutations de type D835 du diagnostic, ces traitements exercent une pression de sélection et font émerger des clones de type FLT3-ITD-TKD. Ces mutations sont détaillées dans le tableau 4.

Des expérimentations sur modèles murins ont permis de démontrer que les clones doubles mutés FLT3-ITD-TKD étaient présents dès le diagnostic, bien qu'indétectables par les techniques classiques, et qu'ils étaient sélectionnés par les traitements.¹⁷⁵ Deux facteurs concourent à l'apparition de ces mutations : (i) l'instabilité génétique secondaire à la mutation FLT3-ITD,^{136,137} et (ii) l'exposition aux cytotoxiques de la première partie du traitement.²¹⁹ Lors de la rechute, la pression de sélection par les inhibiteurs finit par faire émerger ces doubles mutés FLT3-ITD-TKD.²¹⁹

La conformation inactive de la protéine, déstabilisée par des mutations de type « activation-loop », D835 ou Y842, peut néanmoins garder une certaine sensibilité à certains FLT3-ITK de type II en fonction des substitutions : les substitutions hydrophobiques D835Y/V/I/F sont particulièrement résistantes alors que les D835E/N, qui préservent les interactions avec la S838, conservent une certaine sensibilité. Sur le plan clinique, les patients mutés D835 au diagnostic, peuvent éventuellement continuer à être inclus dans les essais testant des FLT3-ITK de type II (quizartinib, sorafenib, ponatinib, pexidartinib) selon le type de substitution. Dans tous les cas la sensibilité aux ITK de type I (crenolanib, midostaurin, sunitinib, lestaurtinib, gilteritinib) est conservée.²²⁰

En situation normale, l'acide aminé en position F691 stabilise le FLT3-ITK dans la poche à ATP après sa fixation. En présence d'une mutation de type « gatekeeper » sur ce résidu, de type F691L par exemple, cette stabilisation ne se fait plus et l'ITK n'est plus efficace. Néanmoins, si le pexidartinib, un FLT3-ITK de type II, est efficace contre cette mutation, il ne le sera pas pour autant contre les mutations

« activation-loop » de type D835, puisqu'elles émergent sous ce traitement comme sous quizartinib.¹⁸⁰ La résistance croisée avec le sorafenib a été confirmée *in vitro*.

Si ces mécanismes de mutation ponctuelle ont initialement été considérés comme responsables de la quasi-totalité des rechutes après obtention d'une sensibilité initiale au quizartinib, des données récentes en « Single Cell Analysis » ont démontré que ces résistances sont extrêmement polyclonales et que des clones FLT3-ITD sans mutation dans leur TKD accompagnaient des clones FLT3-ITD-TKD, confirmant que les mécanismes de rechutes sont multiples, et souvent « off-target », tels que ceux observés chez les patients réfractaires primaires aux traitements (Figure 10).²¹⁹

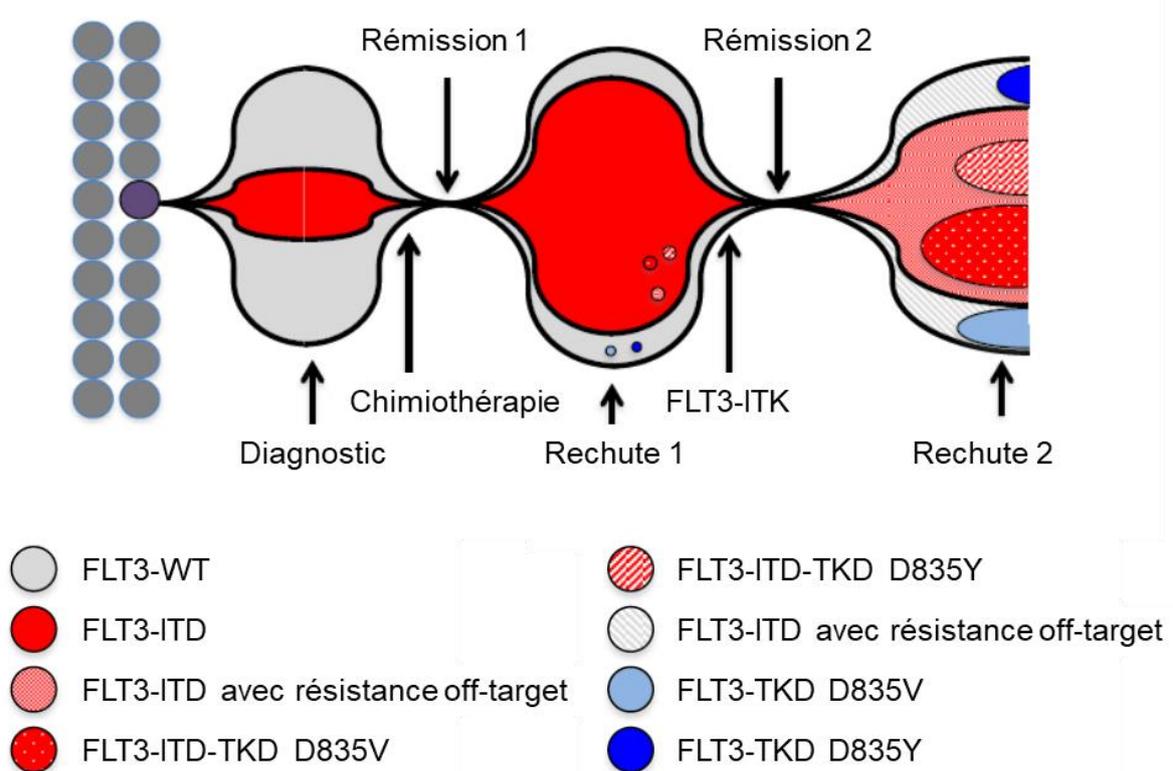


Figure 10 : Modèle d'évolution clonale de blastes LAM FLT3-ITD et FLT3-WT après chimiothérapie conventionnelle puis après traitement par FLT3-ITK, exemple du quizartinib, d'après Smith *et al.*, *Blood* 2017.²¹⁹

Récepteurs indépendants

De nombreux travaux ont démontré le rôle « bypass signaling » d'autres TK, qui maintiennent une signalisation oncogénique active en dépit d'une persistance de l'inhibition de la cible initiale. Cette signalisation assure la survie des cellules sous la dépendance d'un oncogène lorsque celui-ci est inhibé dans de nombreux cancers et dans les LAM FLT3-ITD.

La Spleen Tyrosine Kinase (SYK) est une TK cytosolique jouant des rôles variés dans la biologie cellulaire par l'interaction de ses domaines SH2 avec les « Immunoreceptor tyrosine-based activation motif » ou motifs ITAM. SYK fait partie des TK interagissant avec le FLT3-WT et le FLT3-ITD dont elle augmente la phosphorylation en position Y₇₆₈ du domaine insert et Y₉₅₅ de la partie C-terminale, induisant une suractivation du récepteur, et secondairement une résistance aux FLT3-ITK. Son rôle semble ainsi majeur *in vivo* dans l'acquisition du phénotype de SMP FLT3-ITD murin et dans la sensibilité aux FLT3-ITK,²²¹ mais pourrait aussi s'avérer une cible thérapeutique pertinente dans d'autres sous types de LAM.²²² Par ailleurs, il a été démontré que SHP2, la phosphatase codée par le gène *PTPN11*, impliquée dans l'activation de Erk FLT3-dépendante, était aussi impliquée dans l'activation de STAT5 induite par le FLT3-ITD. Cette phosphatase s'associe au FLT3-ITD par sa Y₅₉₉, fréquemment dupliquée dans les ITD, et à STAT5, qu'elle accompagne dans le noyau en augmentant son activité pro-oncogénique.²²³ Enfin, SYK interagit aussi avec la Y₅₉₉, et est co-recruté avec SHP2, ces deux protéines coopèrent finalement dans l'activation de STAT5.²²⁴ SYK a aussi été retrouvé comme interagissant d'AXL dans la Leucémie Lymphoïde Chronique et la LMC.^{225,226}

Les serine/threonine kinases PIM sont des kinases impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire à travers la régulation transcriptionnelle de MYC et l'inhibition de protéines pro-apoptotiques. Leur expression est classiquement sous la dépendance de la voie JAK2-STAT5 cytokine-dépendante, mais elle est aussi présente dans les LAM FLT3-ITD. Ces dernières semblent effectivement sensibles à un inhibiteur de PIM1 en monothérapie,²²⁷ et aussi en association à un FLT3-ITK,^{141,228} ou à une chimiothérapie conventionnelle.²²⁹ Des résultats similaires ont été obtenus avec PIM2.²²⁸ Par ailleurs PIM1/2 phosphoryle CHK1 sur la S280, impliquant une résistance aux stress génotoxiques chimio-induits,²³⁰ et un rôle pro-prolifératif.²³¹

Le récepteur TK AXL est un troisième candidat dans cette catégorie, nous l'envisagerons dans le chapitre III.B.2 « Biologie d'AXL dans les LAM ».

Certaines mutations, au sein de *RAS* ou de *CBL*, ont aussi été décrites sous FLT3-ITK, permettant le maintien de la signalisation oncogénique. Enfin, les mécanismes de résistance à l'apoptose induite par les FLT3-ITK peuvent être directement modifiés par la surexpression STAT5-dépendante de protéines anti-apoptotiques telles que BCLXL et BCL2. Démonstré dans tous types de LAM, cela reste vrai vis-à-vis des FLT3-ITK et l'utilisation d'inhibiteurs de BCL2 restaure la sensibilité aux inhibiteurs de FLT3.²³² Le même profil de résultats a été retrouvé avec MCL1, autre membre de la famille de BCL2.²³³

Plusieurs messages se dégagent des nombreuses publications et abstracts relatifs aux essais cliniques testant les FLT3-ITK : (i) la majorité des réponses en monothérapie est limitée à une clairance des blastes périphériques et (ii) leur efficacité nécessite une inhibition profonde et soutenue du FLT3-ITD. Enfin, (iii) l'association à des chimiothérapies conventionnelles sera indispensable pour atteindre les compartiments FLT3-WT de la maladie leucémique dans son ensemble. Les protocoles SORAML et RATIFY ont permis de démontrer que ces associations sont faisables et relativement efficaces.

Différents mécanismes de résistance ont émergé :

- intrinsèques à la cellule - ils sont principalement secondaires à des mutations ponctuelles ou à des mécanismes de « bypass signaling »
- extrinsèques à la cellule - ils sont en lien avec son microenvironnement et seront abordés dans le chapitre suivant.

II. Microenvironnement médullaire

En condition physiologique, les CSH sont retrouvées dans la moelle osseuse, au sein de niches spécialisées caractérisées par un microenvironnement spécifique. Ces CSH sont des cellules rares, multipotentes, ayant des capacités d'autorenouvellement permettant de maintenir une hématopoïèse continue. Le remodelage de ce microenvironnement a émergé comme un élément déterminant dans le développement des hémopathies malignes.

A. Niche hématopoïétique

L'hématopoïèse se fait initialement dans le sac vitellin, puis les CSH naissent au sein de l'endothélium hémogénique, associé aux vaisseaux sanguins embryonnaires, essentiellement à partir de l'aorte dorsale, d'autres sites ayant été décrits. L'hématopoïèse gagne ensuite le foie fœtal, la rate, et enfin la moelle osseuse.²³⁴ La notion même de niche hématopoïétique a été évoquée pour la première fois en 1978 par R. Schofield,²³⁵ « [...] *an environment [...] to explain the unlimited proliferation and failure to mature [...] of stem cells, although no direct evidence for this actually exists* ».

Les premières analyses de localisation des CSH permettront de proposer la notion de « niche vasculaire » en 2005.²³⁶ Les reconstructions 3D permettront de démontrer que 80% des CSH sont proches des sinusoides veineux, 10% sont proches des artérioles, 10% sont au niveau de zones de transition et enfin une infime partie est proche de l'endosteum.²³⁷ Au final, le modèle actuellement le plus consensuel est celui d'un seul type de niche hématopoïétique, avec des zones aux fonctions distinctes que nous allons discuter dans le chapitre suivant (Figure 11).²³⁸

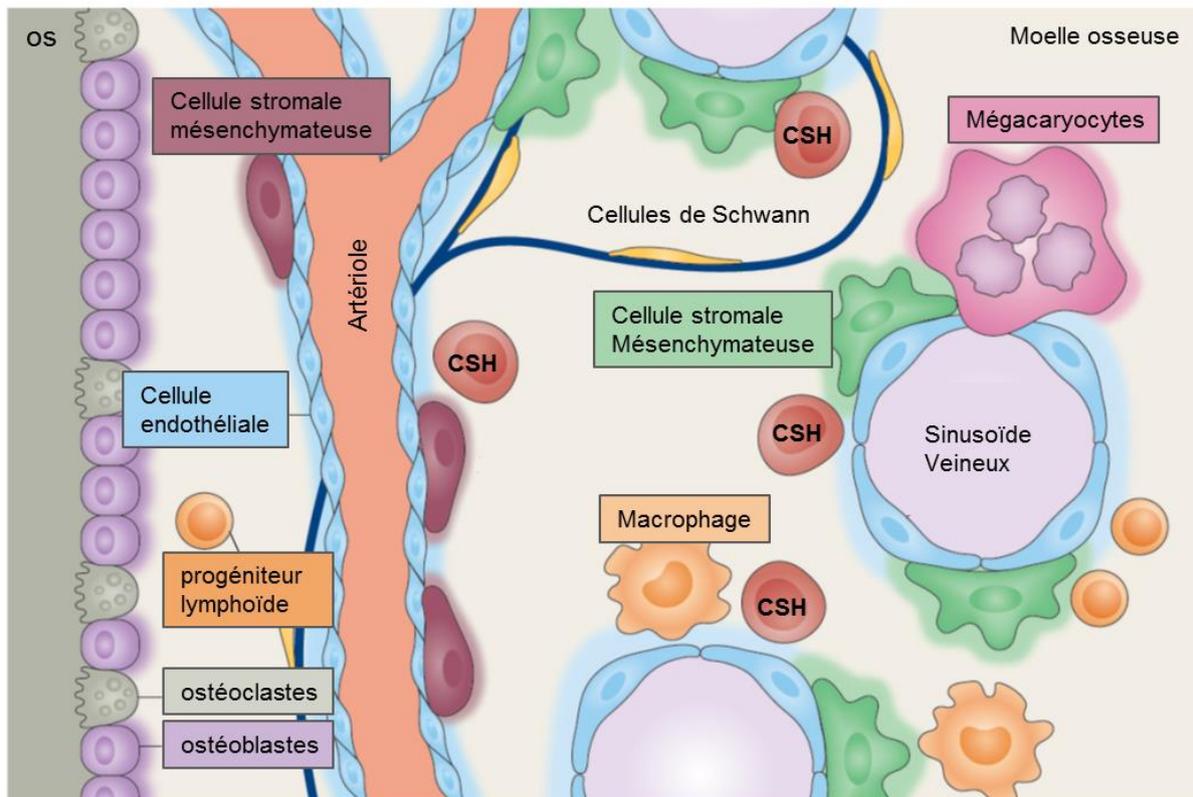


Figure 11 : Représentation schématique de la niche hématopoïétique adulte d'après Crane & Morrison, *Nat Rev Immunology* 2017.²³⁴

1. Composante cellulaire

Dans sa revue publiée dans *Nature* en 2014, S.J. Morrison dichotomise les composants cellulaires de la niche hématopoïétique en deux sous types.²³⁹

- ✓ Les cellules essentielles comprennent les cellules endothéliales, les cellules stromales mésenchymateuses et les mégacaryocytes ;
- ✓ Les cellules accessoires comprennent les ostéoblastes, les macrophages et les cellules nerveuses.

Ce modèle semble actuellement admis par la plupart des équipes.

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM), périvasculaires, sont des cellules du lignage mésenchymateux, produisant os, cartilage, cellules adipeuses et diverses cellules stromales fibroblastiques ayant un rôle essentiel dans le « homing » des CSH et la construction des composantes de la matrice extra-cellulaire. Les CSM sont des cellules rares qui enveloppent artérioles et sinusoides et sont au contact direct avec le côté extra-luminal des cellules endothéliales. Ces CSM périvasculaires partagent des propriétés fonctionnelles avec les péricytes, plus largement retrouvés autour des vaisseaux sanguins. Bien qu'il y ait un chevauchement fonctionnel entre les différentes populations de CSM, en termes de capacités de multipotence et d'autorenouvellement, leur distribution dans la cavité médullaire et leur association avec les vaisseaux sanguins peut être grossièrement divisée sur la base de l'expression du CXCL12 (ou SDF1), ligand de CXCR4. Une fraction de CSM sont dites « CXCL12-Abundant Reticular » et jouent un rôle important dans l'autorenouvellement et l'engagement des CSH.²⁴⁰ Au-delà du CXCL12, elles sécrètent du SCF,²⁴¹ et de la TPO.²⁴²

Les cellules endothéliales sont localisées à l'interface entre flux sanguin et environnement stromal. Ces cellules sécrètent de nombreux facteurs solubles tels que le CXCL12,²³⁸ expriment des ligands de NOTCH,²⁴³ des molécules d'adhésion de type E-selectin,²⁴⁴ des récepteurs tels que TIE2 exprimé également par les CSH,²⁴⁵ qui sont chacun des éléments clés dans le « homing », la prolifération ou le maintien en quiescence des CSH.

Les mégacaryocytes matures sont associés, de manière transitoire, avec les vaisseaux sinusoides lors de la libération des plaquettes. Ils sécrètent, entre autres, de nombreux facteurs de maintenance en quiescence des CSH, tels que la TPO,²⁴⁶ CXCL4,²⁴⁷ TGF β 1 et FGF1, en condition d'homéostasie ou de stress.²⁴⁸

Les composants cellulaires accessoires de la niche hématopoïétique ont été identifiés comme tels en réalisant des inactivations conditionnelles de gènes dans des modèles murins. Ces expérimentations ont démontré que leur absence n'influçait pas le nombre de CSH, mais leur différenciation ou leur capacité de migration. Leur rôle, accessoire dans le maintien des CSH, n'en est pas moins majeur dans l'hématopoïèse :

Les ostéoblastes sont issus de la différenciation des CSM. Ils expriment des facteurs importants pour les CSH mais de manière redondante avec les cellules essentielles : CXCL12 et SCF entre autres. La proximité d'une partie des CSH avec les ostéoblastes avait initialement fait naître la notion de niche endostéale.²⁴⁹ Ce concept sera finalement abandonné au profit de celui de plusieurs niches vasculaires, dont certaines sont situées au sein de l'endosteum.²⁵⁰ Néanmoins, l'absence d'ostéoblaste induit une déplétion profonde et rapide en progéniteurs lymphoïdes B suggérant un rôle clé dans leur maintenance et leur différenciation,²⁵¹ en partie grâce à leur capacité à sécréter de l'IL-7 : ils sont au centre du maintien de la lymphopoïèse B.²⁵²

Enfin, les macrophages spécialisés du tissu osseux et les ostéoclastes jouent un rôle indirect en régulant la quantité d'ostéoblastes et la différenciation des CSM.

In fine, chacune de ces composantes cellulaires joue un rôle dans le maintien de l'hématopoïèse normale, que ce soit directement pour les composants essentiels ou indirectement pour les composants accessoires. D'autres facteurs clés doivent être cités tels que la matrice extra-cellulaire (MEC), dont la complexité rend l'identification de l'effet d'un facteur déterminé difficile. Les éléments les plus abondants sont la fibronectine, les collagènes, la laminine et l'élastine. La densité de cette matrice et la présentation de ligands agissent directement ou indirectement, en synergie ou pas dans le maintien de l'hématopoïèse. D'autres cellules sont importantes, telles que les cellules nerveuses du système nerveux sympathique, et d'autres sous types cellulaires tels que les adipocytes, *etc.*

Au-delà de sa fonction principale d'organe hématopoïétique, la moelle osseuse a une fonction d'organe lymphoïde primaire et secondaire, contenant des lymphocytes matures B et T, des plasmocytes, des cellules dendritiques, des polynucléaires neutrophiles et des macrophages. Au-delà du rôle des macrophages discuté plus haut, les cellules immunitaires définissent une « niche immunitaire » impliquée dans la régulation de l'hématopoïèse en homéostasie et en condition de stress.

2. Composante soluble

Dans sa revue publiée dans *Nature Reviews Immunology* en 2017, S.J. Morisson identifie trois principaux facteurs solubles requis pour le maintien des CSH. (i) Le SCF, ligand du RTK KIT exprimé par les CSH, peut être soluble ou lié à la membrane et cette localisation particulière semble être spécifiquement reliée à la maintenance des CSH.²⁵³ (ii) Le CXCL12 permet une rétention des CSH au sein de leur niche, grâce à leur récepteur CXCR4. La signalisation dépendante du couple CXCL12/CXCR4 régule aussi la prolifération et la rétention des progéniteurs, myéloïdes et lymphoïdes, au sein de la MO.^{240,254} Enfin, (iii) la TPO et son récepteur MPL, sont requis tous deux pour la maintenance des CSH.^{255,256} La TPO est produite par le foie et localement par les CSM et les mégacaryocytes, la prévalence du rôle de la TPO sur les CSH en fonction du site de sécrétion est un domaine actuellement inconnu.

D'autres facteurs solubles sont importants pour la fonction des CSH mais ne sont pas requis pour leur maintenance, au moins en condition d'homéostasie physiologique. Ils peuvent néanmoins être nécessaires en condition de stress, tels que l'angiogénine, l'ANGPT3, le FGF1, le FGF2, l'IL-6 et la pleiotrophine.²³⁴ Au-delà de la boucle autocrine sur les CSH, l'ANGPT1 va activer son récepteur TIE2 à la surface des cellules endothéliales et réguler la régénération de la niche vasculaire.

En effet, le système vasculaire de la moelle osseuse, constituant à part entière du microenvironnement médullaire, est essentiellement composé d'un réseau dense de petites artérioles et de sinusoides veineux, reliés par des zones de transition. Au sein de ce réseau, le flux sanguin va créer des conditions physico-chimiques particulières en termes de pH, de métabolites divers, et de pressions en O₂.

3. Composante hypoxique

La concentration en O₂ dans les tissus humains varie de 1 à 14%. La concentration la plus communément admise dans les régions péri-sinusoidales contenant les CSH est de l'ordre de 1% chez la souris.²⁵⁷ Le sang, lui-même, présente une concentration en O₂ allant de 14% dans les artères à 5% dans les veines.

Dans ce contexte, les conditions expérimentales classiques en Hématologie ne sont pas physiologiques, puisque les cellules sont en condition « hyperoxique » lorsque nous les utilisons *in vitro*.²⁵⁸ Néanmoins, par souci de simplification, nous conserverons le terme d'« hypoxie » quand les concentrations d'O₂ sont en dessous des 20-21% mesurées dans l'air ambiant. Ces basses pressions en O₂ correspondent en réalité à des conditions de « normoxie *in situ* » pour les CSH ou encore à une « physioxie » selon les termes utilisés par les référents du domaine.

Il est, en effet, démontré que les CSH proches des artérioles ont de faibles niveaux de dérivés réactifs de l'O₂, alors que les cellules proches des sinusoides ont des niveaux élevés de dérivés réactifs de l'O₂, augmentant leur migration et leur engagement dans la différenciation.²⁵⁹ Finalement, les CSH ont un phénotype « anaérobie », nécessaire au maintien de leur potentiel de « stemness », qui implique une utilisation de la glycolyse plutôt que de la phosphorylation oxydative.²⁶⁰ Certains arguments plaident pour un profil métabolique plus spécifique de la cellule que du contexte dans lequel elle se trouve : les travaux autour de la localisation des CSH, cités précédemment, ont aussi démontré que la localisation des CSH les plus « hypoxiques », n'était pas strictement corrélée à une distance particulière des vaisseaux sanguins, ni à leur statut dans le cycle cellulaire.²⁶¹

Finalement, les niches hypoxiques sont probablement plus adaptées au métabolisme des CSH plutôt que l'inverse. De plus, il a été démontré que certains facteurs solubles typiquement associés à la niche hématopoïétique, tels que la TPO et le SCF, étaient capables de stabiliser la protéine HIF1 α , médiateur de la réponse cellulaire à l'hypoxie, quelles que soient les pressions partielles en O₂.^{262,263}

***In fine*, la niche hématopoïétique constitue un microenvironnement particulier, qui peut se simplifier à trois composantes : (i) des cellules spécialisées : au premier rang desquelles se situent les CSM ; (ii) une composante soluble avec trois facteurs clés du maintien des CSH : SCF, TPO et CXCL12 ; enfin (iii) des caractéristiques physico-chimiques particulières dont le facteur le plus classique est une basse pression en O₂.**

Ce microenvironnement spécifique est aussi le site de naissance puis de maintien des LIC.

B. Niche leucémique

Le concept d'« envahissement » de la niche hématopoïétique par une hématopoïèse leucémique implique plusieurs rôles physiopathologiques particuliers. Le premier, que nous qualifierons de permissif, implique le remplacement de l'hématopoïèse normale par son homologue maligne et la transformation de la niche hématopoïétique en niche leucémique. Le second est conducteur, phénomène dans lequel la transformation leucémique est, au moins en partie, conduite par des modifications de son microenvironnement. Enfin, un troisième rôle apparaîtra durant l'intervention thérapeutique : le rôle protecteur de la niche hématopoïétique.

1. Rôle permissif

Ce premier rôle concerne la capacité du microenvironnement à laisser l'hématopoïèse leucémique remplacer l'hématopoïèse normale pour diminuer la compétition avec cette dernière. Les LIC s'emparent effectivement des niches vasculaires où elles sont maintenues par les signaux de l'axe CXCL12/CXCR4,²⁶⁴ remodelant la niche hématopoïétique aux dépens des CSH normales.

Ce rôle régulateur négatif de la niche leucémique a été formellement démontré en 2008 par Colmone *et al.* dans un modèle murin. Ces travaux ont prouvé que la présence de cellules leucémiques remodelait la niche hématopoïétique, qui n'était plus apte à soutenir une hématopoïèse normale. Pourtant, les cellules CD34⁺ normales y étaient attirées, puis piégées par un mécanisme dépendant de l'axe SCF/KIT. A l'issue, les CSH normales ne sont plus capables d'y assurer leur fonction et leur nombre diminue avec le temps.²⁶⁵

Inversement, les LIC deviennent insensibles à une partie des voies contrôlant la prolifération et la différenciation des CSH, tels que NOTCH et TGF β ,²⁶⁶ ou Wnt/ β -catenin.²⁶⁷ Parallèlement, les LIC sont plus dépendantes de molécules d'ancrage telles que le CD44.²⁶⁸ Elles sont aussi plus sensibles aux cytokines pro-inflammatoires : l'IL-1 exerce un rôle pro-prolifératif sur les cellules leucémiques à travers la voie des MAPK, alors qu'elle inhibe les progéniteurs hématopoïétiques normaux.²⁶⁹ Des résultats similaires ont été obtenus avec le TNF α .²⁷⁰

Enfin, il est démontré que la sécrétion d'IL-1 par des LIC JAK2 V617F altère le système nerveux sympathique médullaire qui, lui-même, régule les CSM. Celles-ci vont quantitativement diminuer, parallèlement à la sécrétion de CXCL12, facilitant le remplacement de l'hématopoïèse normale par le syndrome myéloprolifératif.²⁷¹

Le rôle plus général des cytokines dans le soutien des LIC a aussi été établi dans des modèles murins qui montraient de meilleures capacités à supporter une hématopoïèse leucémique lorsque la niche était humanisée,²⁷² notamment avec l'IL-3 et la TPO.²⁷³

Dans le cas spécifique des LAM FLT3-ITD, la mutation induit des profils d'expression géniques particuliers, relatifs, entre autres, à l'inflammation (TNFS9, TNFRS, TNFRSF18, CCL1, CCL5) et à la signalisation cytokinique (IL2RA, IL3RA).^{274,275} Ce programme transcriptionnel induit la sécrétion de TNF α et d'IL-1 qui vont, là encore, soutenir la cellule leucémique.^{270,276} Parallèlement ces deux cytokines vont aussi altérer quantitativement et qualitativement les cellules endothéliales et les CSM du microenvironnement médullaire.¹⁷¹ L'ensemble de ces phénomènes conduit à la mort cellulaire des CSH normales et à l'amplification des clones FLT3-ITD à leurs dépens. Accessoirement, cette sécrétion cytokinique de TNF α et d'IL-1 est directement responsable du phénomène d'adhésion des blastes à l'endothélium vasculaire dont la traduction clinique ultime est la leucostase.²⁷⁷

Ces quelques exemples, retrouvés dans des modèles physiopathologiques différents, illustrent les profondes divergences de perception des signaux du microenvironnement reçues par les CSH ou les LIC, permettant à l'hématopoïèse leucémique de s'expandre aux dépens de l'hématopoïèse normale, et enfin de modifier la niche hématopoïétique à son avantage. C'est le deuxième axe de la niche permissive :

La présence des cellules leucémiques va induire des changements structuraux dans la cavité médullaire, dus à des modifications de l'angiogenèse et de l'ostéosynthèse.²⁷⁸ Dans les SMD, il semble exister un nombre anormalement élevé de CSM de type « CXCL12-Abundant Reticular », ce qui pourrait contribuer à une rétention aberrante des cellules au sein de la moelle dans cette hémopathie.²⁷⁹ Inversement, les CSM dérivées de moelle osseuse de patients atteints de LAM

diminuent leur sécrétion de CXCL12,²⁸⁰ ce qui pourrait contribuer aux moindres facultés de maintien des CSH normales.

Enfin, il a été démontré que les blastes de LAM sécrètent de l'IL-10 qui éduque les cellules stromales à produire du GAS6 qui active AXL, RTK impliqué dans la survie des cellules en conditions de privation en nutriments et en O₂, conditions observées dans le microenvironnement des LIC.²⁸¹ En d'autres termes, la LIC crée une boucle paracrine qui va soutenir son propre maintien. Ce point sera détaillé dans le chapitre III.B.2. « Biologie d'AXL dans les LAM ».

Des modifications d'autres types cellulaires ont été démontrées, notamment les adipocytes dans lesquels les cellules de LAM modifient les processus métaboliques, activent la lipolyse et récupèrent les acides gras, ainsi sécrétés, pour leur propre utilisation.²⁸²

2. Rôle conducteur

Si le rôle permissif de la niche hématopoïétique dans la leucémogénèse est établi, son rôle de « niche leucémogène » reste discuté.

Certaines anomalies génétiques, telles qu'une délétion de *Dicer1*, dans les CSM à différenciation ostéoblastique sont susceptibles d'induire une sous-expression de *Sbds* qui induit le phénotype myélodysplasique.²⁸³ Le gène *Sbds* est muté dans le syndrome de Shwachman-Diamond et cette mutation dans les cellules hématopoïétiques elles-mêmes ne produit pas de phénotype de SMD. Inversement, la mutation au sein des CSM induit un stress génotoxique des CSH et un phénotype de SMD, tel qu'il est observé chez les patients porteurs du syndrome malformatif secondaire à une mutation constitutionnelle.²⁸⁴

Dans le syndrome de Noonan, la mutation constitutionnelle de *PTPN11* induit un syndrome malformatif chez des enfants qui ont un risque particulièrement élevé de développer une Leucémie Myélomonocytaire Juvénile. Il a été démontré que les CSM, porteuses de la mutation, sont susceptibles, à elle seules, d'induire le phénotype de l'hémopathie dans un modèle murin.²⁸⁵

Enfin, une autre étude récente suggère que les cellules endothéliales peuvent, elles aussi, jouer un rôle direct dans l'initiation de la maladie. Physiologiquement,

l'expression du microARN-155, est réprimée par le régulateur transcriptionnel RBPJ activé par la voie NOTCH. En l'absence d'activation de cette dernière, RBPJ ne réprime plus la transcription de miR-155 dans les CE, sa cible classique étant κ B-RAS1, inhibiteur de l'activation de NF κ B, cette dernière voie est activée, entraînant une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , induisant, là encore, un phénotype de SMP.²⁸⁶ L'augmentation du TNF α a aussi été démontrée comme causale dans un modèle murin « RAR γ -null », dans lequel les souris développaient un phénotype de SMP totalement dépendant des perturbations du microenvironnement.²⁸⁷

Globalement, ces phénomènes semblent induire une domination de l'hématopoïèse leucémique sur l'hématopoïèse normale conduisant la plupart du temps à l'apparition de phénotypes myéloprolifératifs ou myélodysplasiques. Une équipe a démontré que ce concept était applicable aux hémopathies aiguës en démontrant qu'une mutation activatrice de la β -catenin dans les ostéoblastes induisait rapidement un phénotype proche d'une LAM avec anomalies génétiques clonales évocatrices dans un modèle murin. Dans ce modèle, FOXO1 interagit avec la β -catenin pour induire l'expression de JAGGED1 par les ostéoblastes, ligand de NOTCH. L'activation de la voie NOTCH dans les CSH induira finalement leur transformation leucémique.^{288,289}

Ensemble, ces études conduites dans des modèles murins illustrent le rôle potentiellement causal, pour chacun des composants cellulaires de la niche hématopoïétique, dans le développement d'hémopathies myéloïdes. Trois mécanismes principaux apparaissent : (i) diminution des facteurs de soutien à l'hématopoïèse normale, (ii) rôle des voies NOTCH et Wnt/ β -catenin, enfin (iii) augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment du TNF α et de l'IL-1. Ces CSH, « primées » par leur microenvironnement, maintiendraient leurs capacités d'autorenouvellement et de différenciation et l'acquisition d'un hit leucémique pourrait, finalement, induire un phénotype de leucémogénèse aboutie.

3. Rôle protecteur et mécanismes de résistance extrinsèques

Au-delà de son rôle dans le processus de leucémogénèse, permissif ou partiellement conducteur, le microenvironnement médullaire confère une protection

aux cellules leucémiques. Ce rôle s'exerce à travers des mécanismes qui recourent les caractéristiques évoquées plus haut : facteurs solubles, interactions cellule-cellule et cellule-MEC, basse pression en O₂. Nous allons artificiellement les séparer pour présenter certaines données mais elles sont extrêmement intriquées et se produisent de manière concomitante.

a. Rôle des facteurs solubles

Différentes cytokines et facteurs de croissance ont largement été impliqués dans ces phénomènes :

Le FLT3-ligand est une cytokine dont la sécrétion et le niveau plasmatique augmentent après les chimiothérapies aplasiantes, notamment au fur et à mesure des chimiothérapies de consolidations de LAM. Ces taux élevés de FL diminuent fortement l'efficacité des FLT3-ITK.²⁹⁰ D'autres travaux ont démontré que cette résistance aux FLT3-ITK était secondaire à une augmentation STAT5-dépendante de BIRC5, inhibiteur des voies apoptotiques. Parallèlement, les SOCS étaient inhibés par méthylation, permettant de maintenir la signalisation STAT5-dépendante.²⁹¹

Le rôle de la TPO dans ce contexte est encore discuté. Son rôle central dans le maintien des CSH normales pourrait suggérer un rôle similaire dans l'hématopoïèse leucémique. Son niveau d'expression semble plus élevé chez les patients atteints de LAM, et son rôle dans la résistance aux chimiothérapies conventionnelles a été proposé.²⁹² Son niveau sérique au diagnostic est corrélé aux leucopénies et thrombopénies, mécanismes reliés au niveau d'expression de son récepteur par les cellules leucémiques. Ces dernières captent la TPO, qui est moins biodisponible pour les CSH normales, provoquant des cytopénies.²⁹³ Environ 50 à 60% des LAM expriment le récepteur MPL,²⁹⁴ et si la survie globale et les taux de RC ne semblent pas affectés directement par son niveau d'expression, la durée de RC est significativement plus faible chez les patients MPL⁺.²⁹⁵ *In vitro*, son rôle pro-prolifératif est démontré sur les blastes MPL⁺,²⁹⁶ dans un modèle de LAM de type CBF. La TPO active alors la voie PI3K/AKT/mTOR,²⁹⁷ puis vraisemblablement BCLXL.²⁹⁸

Dans les travaux cités ci-dessus, l'IL-3 induit une réponse similaire alors que l'IL-6 et le SCF sont sans effet. L'IL-3 joue vraisemblablement un rôle au moins aussi important dans la LAM que la TPO puisqu'une sous-unité de son récepteur, le CD123

est surexprimé dans la majorité des LAM,⁶⁷ notamment FLT3-ITD.²⁹⁹ La proportion de LIC qui l'exprime est directement corrélée à un mauvais pronostic,³⁰⁰ et à de plus grandes capacités de greffe dans un modèle murin.⁶⁷ Le récepteur est composé de 2 sous-unités, la sous-unité α (CD123) confère la spécificité du ligand alors que la sous-unité β est commune aux récepteurs au GM-CSF, à l'IL-3 et à l'IL-5 (Figure 7).

D'autres chimiokines sont impliquées, notamment l'axe CXCL12/CXCR4 qui joue un rôle non seulement dans le maintien des LIC dans leur microenvironnement, mais aussi dans la résistance aux chimiothérapies *in vivo*.³⁰¹ Plus généralement, le rôle des cytokines et des facteurs de croissance a aussi été démontré par l'efficacité des inhibiteurs de JAK1/2 dans la suppression de la protection permise par les co-cultures stromales, incluant la protection contre les inhibiteurs de BCL2,³⁰² ou encore à travers le rôle important de STAT5 dans la protection contre les ITK dans la LMC.³⁰³ Les facteurs de croissance tels que le VEGF sont aussi impliqués,³⁰⁴ le rôle de ce dernier pourrait être particulièrement important car hautement régulé par les basses pressions en O₂.

b. Rôle des interactions cellule-cellule et cellule-MEC

Les interactions des cellules leucémiques avec leur environnement, particulièrement les LIC, participent à cette protection contre les traitements, en partie à travers les facteurs solubles discutés plus haut mais aussi via les molécules d'adhésion.

Le contact cellule-cellule implique des mécanismes de protection passant par de multiples voies : autophagie,³⁰⁵ modifications métaboliques,³⁰⁶ transferts de mitochondries,³⁰⁷ activation des cellules endothéliales et quiescence leucémique,³⁰⁸ etc. Certains travaux ont suggéré un mécanisme contre-intuitif : sur stroma, l'inhibition du FLT3 stimulerait la prolifération de CSH FLT3-ITD.³⁰⁹ Cet effet suspecté du rôle pro- « stemness » des ITK, avait déjà été suggéré dans la LMC, dans laquelle l'imatinib restaure l'expression d'une signature souche de cellules Phi+ dans un modèle d'« induced pluripotent stem cells ». ³¹⁰ Récemment, Giustacchini *et al.* ont identifié, grâce à une approche en « Single Cell Analysis » *ex vivo* sur des échantillons de patients atteints de LMC, la présence de deux populations étiquetées « Phi+ LIC ». Une population présentait une signature transcriptomique « proliférative » et une seconde présentait une signature « quiescente ». Cette dernière bénéficiait d'une

expansion, et non pas d'un simple maintien, au cours du traitement par imatinib. Ces « Phi⁺ LIC » étaient caractérisées par une dérégulation des voies TGF β , TNF α et JAK/STAT suggérant, selon les auteurs, que le microenvironnement était responsable de la persistance et de l'expansion de ces « Phi⁺ LIC » quiescentes, sous imatinib.³¹¹ L'ensemble de ces concepts, plus aisés à appréhender dans la LMC que dans la LAM FLT3-ITD, reste à démontrer dans les hémopathies aiguës mais pointent des perspectives de recherche et de développement autour de nouvelles cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes.

Le contact cellule-MEC est aussi impliqué, notamment à travers le CD44, récepteur entre autres au collagène, qui est particulièrement exprimé aux pourtours de l'endosteum, participant au maintien à un stade indifférencié des cellules leucémiques, et à leur « stemness ».⁶⁸

c. Rôle des basses pressions en O₂

Le rôle de l'hypoxie dans la protection des cellules cancéreuses a, initialement, été évoqué et défini dans les tumeurs solides qui présentent de nombreuses régions hypoxiques.

Le niveau d'hypoxie a été corrélé à la résistance à de nombreux traitements, chimiothérapie et radiothérapie, ainsi qu'à un mauvais pronostic avec une incidence plus fréquente de rechutes locales et de métastases. Il a même été démontré que l'hypoxie tumorale laissait une empreinte de quiescence dans les cellules cancéreuses de la tumeur primaire, qui disséminaient ensuite sous forme métastatique. A l'issue, ces cellules perdaient la signature « hypoxique » mais conservaient la signature « quiescente ». En d'autres termes, les niveaux d'O₂ variables dans la tumeur primaire laissent leurs empreintes jusque dans les métastases.³¹²

Dans les leucémies aiguës, il est démontré que la stabilisation de HIF1 α par les basses pressions en O₂ induit une chimiorésistance HIF1 α -dépendante. L'inhibition de HIF1 α , pharmacologique ou génétique, restaure la sensibilité aux traitements malgré l'hypoxie et inversement la stabilisation pharmacologique de HIF1 α en condition « normoxique » induit une chimiorésistance, dans les LAL,³¹³ et les LAM.³¹⁴

Par ailleurs, l'hypoxie à 1% d'O₂ induit un raccourcissement permanent de la demi-vie de la protéine FLT3, néanmoins réversible si les cellules sont replacées en normoxie, indépendamment de son statut ITD ou WT. Ce mécanisme de régulation n'est pas retrouvé pour l'EGFR, KIT ou l'EPOR. Parallèlement, la sensibilité à un FLT3-ITK ne semble pas modifiée mais les auteurs ont utilisé du sorafenib, un inhibiteur multi-kinase. Inversement, la sensibilité à l'aracytine est diminuée par les conditions de culture hypoxique.³¹⁵ D'autres travaux dans les LAM FLT3-ITD ont retrouvé que l'hypoxie induisait une suractivation de la voie PI3K/AKT/mTOR et que la co-culture avec des cellules stromales en hypoxie induisait une résistance au sorafenib, contournée par des inhibiteurs de la voie PI3K.³¹⁶

***In fine*, la niche hématopoïétique est permissive au remplacement de l'hématopoïèse normale par une hématopoïèse leucémique à travers des modifications de son microenvironnement.**

Au cours des traitements, les différentes composantes de cette niche permettent de maintenir un réservoir de LIC à travers des mécanismes dépendants de contacts cellule-cellule ou cellule-MEC, des facteurs solubles incluant TPO, IL-3, et CXCL12 et de basses pressions en O₂, activatrices de la voie PI3K/AKT/mTOR impliquée dans la résistance à l'apoptose.

III. AXL et les récepteurs TAM

Les 3 récepteurs tyrosine kinase TAM (RTAM), TYRO3, AXL et MERTK, comprennent un ECD, un TMD et un TKD. Néanmoins, ils se distinguent des autres RTK par (i) une séquence conservée spécifique KW(I/L)A(I/L)ES au sein du TKD et (ii) un ECD très particulier, proche de celui des molécules d'adhésion, avec 2 domaines « Immunoglobulin-like » et 2 domaines fibronectine de type III (FNIII).

Ces motifs jouent un rôle majeur dans le contact cellule-cellule, mimant la structure des NCAM, porteurs de 5 domaines « Immunoglobulin-like » et 2 domaines FNIII. Parmi les autres RTK, seuls TIE1 et TIE2 comprennent à la fois des domaines immunoglobuline et FNIII.

A. Fonctions physiologiques des RTAM

1. Généralités

Les trois membres de la famille des RTAM ont été découverts en 3 ans par plusieurs équipes concomitantes. AXL a été le premier détecté, en 1988, chez un patient atteint de LMC, et a rapidement été identifié comme un gène transformant.³¹⁷ Par la suite sa fonction de RTK a été démontrée en 1991, et son nom est issu du terme grec « *anexelekto* : incontrôlé ». ³¹⁸ La seconde équipe le nommait « Ufo » pour « Unknown Function Of », ³¹⁹ et la troisième « Ark » pour « Adhesion-Related Kinase ». ³²⁰

Le gène *AXL* est en position 19q13.2, sa protéine fait entre 120 et 140 kDa selon son état de glycosylation. Par ailleurs, il existe un épissage alternatif de l'exon 10 donnant une forme raccourcie d'AXL, largement minoritaire. Les conséquences de cet épissage alternatif sont inconnues. Il a été démontré qu'un inhibiteur de la PKC, la staurosporine, parente du midostaurin, induisait cet épissage alternatif. Ce phénomène est lignée-dépendant et non retrouvé dans des cellules cancéreuses mais aucune lignée d'hémopathie n'a été testée. ³²¹

De plus, la partie entre ECD et TMD, codée par l'exon 11, peut être clivée par une protéase et donner lieu, physiologiquement, à un « AXL soluble », capable de se lier aux ligands d'AXL, et diminuer la biodisponibilité de ces derniers. Le rôle physiologique de cet AXL soluble est mal connu ; des analogues synthétiques ont

néanmoins été générés et sont actuellement étudiés comme stratégie thérapeutique dans des modèles pré-cliniques.³²² Ce point sera développé dans le chapitre III.B.3.b « Les récepteurs-leurres anti-ligands ».

Sur le plan transcriptionnel, plusieurs facteurs de transcription ont été impliqués dans la régulation d'AXL : HIF1 α dans les cellules endothéliales,^{323,324} et rénales,³²⁵ MZF1 dans certains modèles tumoraux,³²⁶ SP1 et SP3,³²⁷ STAT1 dans les cellules dendritiques,³²⁸ AP1 dans la LMC.³²⁹ D'autres mécanismes jouent un rôle important dans cette régulation : des cofacteurs de transcription tels que YAP dans le carcinome hépato-cellulaire,³³⁰ ou des mécanismes de méthylation.³³¹ D'autres sites putatifs ont été décrits, sans preuve formelle de leur implication, pour CREB, p300 et CEBP β .³³²

Des homologues d'AXL ont été identifiés dans de nombreux organismes mais les RTAM semblent avoir émergé assez récemment dans l'évolution puisqu'ils ne sont retrouvés ni chez la *Drosophiles* ni chez *Caenorhabditis elegans*.³³³ Cette apparition tardive dans l'évolution est apparentée à leur rôle dans les tissus complexes tels que les tissus hématopoïétiques ou nerveux. L'expression des RTAM apparait tardivement dans l'embryogenèse, 12,5 jours après la fécondation et des travaux de simple, double ou triple « knock-out » de RTAM murins n'ont révélé aucune anomalie de développement embryonnaire ou foetal, suggérant l'absence de rôle essentiel dans l'embryogenèse.³³⁴ Néanmoins, des phénotypes associant lymphoproliférations et pathologies auto-immunes apparaissent avec le vieillissement des souris « knock-out », conséquences d'une hyperactivation des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes.³³⁵

In fine, dans les tissus adultes humains, les RTAM sont relativement ubiquitaires. Leur expression est particulièrement élevée au niveau de la rétine, des monocytes/macrophages, des cellules dendritiques et des NK.³³⁶

2. Activation des RTAM

a. *Ligands canoniques et putatifs*

i. GAS6 et PROS1

Le « Growth Arrest Specific 6 » (GAS6) et la protéine S (PROS1) sont les deux ligands conventionnels des RTAM. Identifiés en 1995, GAS6 a initialement été défini comme un ligand d'AXL, alors que PROS1 était identifié comme un ligand de TYRO3.³³⁷ Au final, GAS6 se lie à chacun des 3 RTAM, avec une affinité similaire pour AXL et TYRO3, mais 3 à 10 fois moindre pour MERTK.³³⁸ PROS1 est un ligand de MERTK et TYRO3, mais ne se lie pas à AXL (Figure 12).

GAS6 et PROS1 partagent 43% d'homologie de séquence. Leurs extrémités N-terminale partagent des résidus d'acides glutamiques qui nécessitent d'être γ -carboxylés par un mécanisme vitamine K-dépendant avant d'être biologiquement actifs. Ces acides carboxyglutamiques permettent alors une liaison Calcium-dépendante aux phospholipides membranaires négativement chargés, tels que les phosphatidyl serine (PtdSer) à la surface des cellules ou corps apoptotiques.

Les analyses de structures cristallines montrent que le premier domaine laminine G-like de GAS6 réalise une interaction avec chacun des 2 domaines immunoglobuline d'AXL, puis deux complexes protéiques 1:1 [AXL:GAS6] se lient pour aboutir à un complexe protéique 2:2. Cette dimérisation induit une transphosphorylation des résidus tyrosines de leur domaine intra-cytoplasmique avec deux conséquences (i) la phosphorylation d'autres substrats et (ii) la fonction de « docking site » qui permet la constitution d'un signalosome.³³⁹

Finalement, les profils d'affinité des ligands pour les récepteurs peuvent être définis en fonction du contexte de l'interaction : en milieu soluble ou en tant que senseur de PtdSer.³⁴⁰ Comme suggéré sur la figure 12, certains auteurs avancent même qu'AXL ne peut être activé par GAS6 qu'en présence de corps apoptotiques, nécessitant donc la réalisation du pontage [corps apoptotiques-GAS6-AXL].^{341,342} Le rôle de GAS6 dans les LAM est particulièrement important, nous le développerons dans l'avant-dernier chapitre.

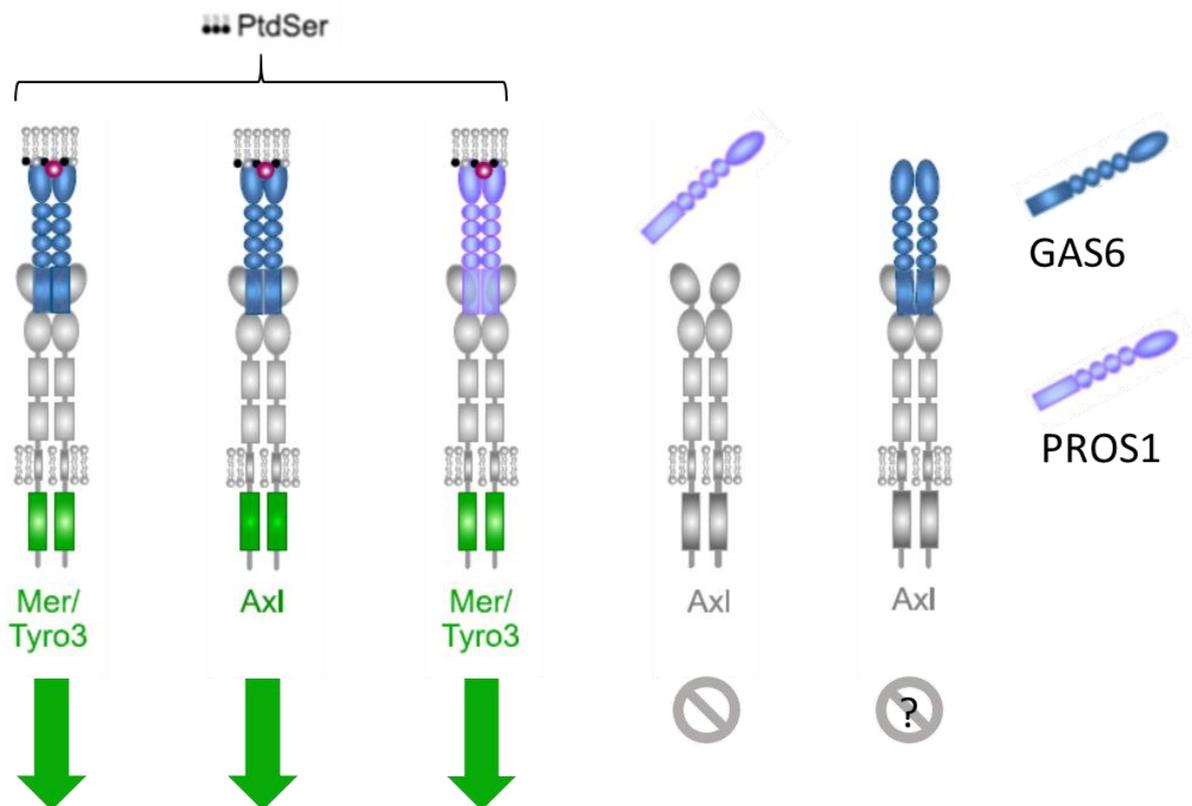


Figure 12 : Activation des RTAM par les ligands GAS6 et PROS1. D'après Lew et al. *eLife* 2014.³⁴¹ En présence de PtdSer, les 3 RTAM sont activés par leurs ligands GAS6 (AXL, MERTK et TYRO3) et PROS1 (MERTK et TYRO3). PROS1 n'active pas AXL, quelque soit la présence ou non de PtdSer. Certains auteurs pensent qu'en l'absence de PtdSer, GAS6 n'active pas AXL (?).

ii. TUBBY et TULP1

Si tubby-like protein 1 (TULP1) a démontré sa capacité à se lier respectivement aux trois RTAM, TUBBY ne se lie qu'à MERTK.³⁴³ Ces deux protéines ont la propriété de s'associer au lipide PI-4,5-P2 de la membrane plasmique grâce à leur extrémité C-terminale. L'activation par une protéine G va entraîner leur relargage et leur translocation vers le noyau. Aucun gène cible formellement démontré n'existe pour TUBBY mais TULP1 interagit avec les gènes de la F-Actine et de la dynamin-1. Par ailleurs, malgré l'absence de peptide signal adapté, TUBBY et TULP1 peuvent être

sécrétés dans le milieu extra-cellulaire, de manière indépendante de la voie canonique réticulum endoplasmique-Golgi.³⁴⁴

A l'issue de leur sécrétion, et parallèlement à GAS6 et PROS1, TULP1 et TUBBY ont des spécificités de liaisons aux RTAM et donc potentiellement des effets tissus-dépendants. Si GAS6 et PROS1 sont bien caractérisés comme se liant au RTAM et aux PtdSer, TUBBY et TULP1 se lient au RTAM et aux corps apoptotiques, mais à ces derniers par un mécanisme encore inconnu.³⁴³ Si leur rôle dans les rétinopathies est démontré, il reste inexploré dans les pathologies cancéreuses. Dans la LAM, leur niveau d'expression est particulièrement bas en comparaison aux autres cancers et aucune mutation n'a été décrite (Annexe).⁵⁰

iii. Galectine 3

Les galectines (GAL) sont une famille de protéines caractérisées par leur affinité pour le β -galactoside. Quatorze membres de GAL sont définis, classés sur la base de leur structure : (1) « prototype » (GAL1, -2, -5, -7, -10, -11, -13 et -14), (2) « chimera-type » (GAL3) et (3) « tandem repeat type » (GAL6, -8, -9 et -12). Ces différents membres ont été impliqués dans de nombreux processus biologiques, incluant la prolifération et l'apoptose.

Les fonctions des GAL sont secondaires à leur capacité de liaison à des glycoconjugués : des carbohydrates associés aux protéines, peptides et lipides. Elles permettent des interactions homo et hétérotypiques entre cellules, facilitent la liaison des cellules à la MEC, modulent les voies de signalisation et participent au regroupement des récepteurs à la surface cellulaire.³⁴⁵

La capacité de la GAL3 à être un ligand de MERTK a été démontrée dans l'activation de l'efferocytose.³⁴⁶ La GAL3 est dérégulée dans un large panel de cancers. L'analyse de ces dérégulations montre des résultats fréquemment contradictoires, non seulement en raison de contraintes techniques mais aussi en raison du caractère intra ou extra-cellulaire de sa localisation subcellulaire, ce qui modifie ses fonctions.³⁴⁷

Dans les LAM, sa surexpression est particulièrement corrélée à l'expression blastique du CD14 et aux mutations de *PTPN11* mais aussi et surtout à un pronostic

particulièrement défavorable.³⁴⁸ Le mécanisme précis reliant la surexpression de GAL3 au pronostic des LAM est inconnu et de multiples hypothèses pourraient être évoquées.

Dans un modèle de LMC, les cellules stromales induisent une sécrétion de GAL3 par les cellules leucémiques, ce qui entraîne une activation des voies PI3K/AKT et MAPK, une accumulation de MCL1, et enfin une résistance aux ITK et aux agents de chimiothérapie conventionnelle.

Enfin, des données *in vivo* suggèrent que la GAL3 joue un rôle dans le « homing » des cellules leucémiques au sein de leur microenvironnement.³⁴⁹ Dans un modèle de LAL, Fei *et al.* ont démontré que les cellules stromales elles-mêmes sécrétaient de hauts niveaux de GAL3 par l'intermédiaire d'exosomes, et que cette sécrétion augmentait quand elles étaient cocultivées avec des cellules de LAL. La GAL3 exosomale, captée par les cellules leucémiques, était internalisée et dirigée vers le noyau.³⁵⁰ Par ailleurs, elle activait MERTK et induisait une résistance aux chimiothérapies.³⁵¹ Enfin, des travaux divers suggèrent son expression hypoxie-dépendante dans un modèle de glioblastome.³⁵²

Sa capacité à être un ligand de TYRO3 et AXL n'a jamais été démontrée.

b. Voies de signalisation et conséquences de l'activation des RTAM

La dimérisation ligand-dépendante des RTAM entraîne une transphosphorylation des résidus tyrosine du domaine intracytoplasmique. Cette phosphorylation induit (i) une augmentation de l'efficacité catalytique de l'activité TK, phosphorylant d'autres substrats et (ii) la constitution de « docking site » pour d'autres molécules de signalisation, aboutissant à des complexes macromoléculaires. Pour MERTK, les résidus Y₇₄₉, Y₇₅₃ et Y₇₅₄ constituent les trois sites d'activation par autophosphorylation et il a été démontré que la transformation en phénylalanine de ces 3 tyrosines aboutissait à une diminution de l'activité kinase de MERTK respectivement de 39%, 10% et 5%, suggérant que les 3 tyrosines sont nécessaires à l'activité complète du récepteur mais que la Y₇₄₉ est la principale. Pour AXL, l'autophosphorylation se fait sur les résidus Y₇₇₉, Y₈₂₁ et Y₈₆₆, supportant les interactions avec PLC, PI3K et GRB2.³³⁶

Enfin, des dimérisations ligand-indépendantes ont été décrites,³⁵³ néanmoins associées à de fortes surexpressions du récepteur. Ce phénomène est classiquement observé dans la biologie des RTK.³³⁹

D'autres rôles atypiques d'AXL et des RTAM sont importants : indépendamment de son activité kinase, AXL peut servir de molécule d'adhésion par agrégation homophile avec les ECD d'AXL de cellules voisines.³⁵⁴ Il a aussi été impliqué comme « docking site » indépendamment de son ligand et de toute activation dans la LMC.³⁵⁵ Enfin, son rôle coopérateur avec d'autres récepteurs a souvent été rapporté : avec les β 3-intégrines,³⁵⁶ avec les récepteurs à l'IFN,³²⁸ et à l'EGF,³⁵⁷ mais aussi entre RTAM dans certains neurones ou macrophages. Ces associations semblent fonction-spécifique.^{358,359}

Enfin, des interactions ont été décrites avec le FLT3 dans différents contextes : l'axe GAS6/AXL contribue au développement normal des NK, notamment en augmentant la différenciation des cellules CD34⁺ en NK sous l'effet de l'IL-15. Cet effet passe par une régulation positive de la phosphorylation du FLT3, AXL-dépendante, secondaire à une interaction physique entre les deux, sous réserve de la présence de leurs ligands respectifs GAS6 et FL.³⁶⁰ Cette interaction entraînant l'activation du FLT3 a aussi été démontrée dans les LAM FLT3-ITD.³⁶⁰ Par ailleurs, sans association directe, AXL est aussi un régulateur positif de l'activation de KIT,³⁶² et de MET.³²⁵

Les voies de signalisation en aval d'AXL sont classiquement la voie des MAPK et la voie PI3K/AKT. Les conséquences de cette signalisation sont néanmoins variables en fonction du sous-type cellulaire dans lequel elles se produisent.³³⁶

L'axe GAS6/AXL induit la prolifération de plusieurs types cellulaires à travers l'activation de la voie des MAPK : la protéine adaptatrice GRB2 interagit via la liaison avec la Y₈₂₁. L'activation de GRB2 induit la cascade d'activation RAS/RAF puis MEK/Erk.³⁶³

Par ailleurs, AXL active la voie PI3K/AKT puis NF κ B/BCLXL. L'activation de ces voies de signalisation passent aussi par la Y₈₂₁ qui se lie à PLC γ 1, PI3K, SRC, la Y₈₆₆ se lie aussi à la PLC γ 1 et enfin la Y₇₇₉ constitue un site non essentiel et de faible affinité de liaison de PI3K (Figure 13).

In fine, les conséquences de la stimulation des RTAM vont dépendre : du récepteur, du ligand, de l'environnement dans lequel cette interaction se produit, et enfin de la cellule. Nous allons voir que leurs rôles sont partiellement redondants ou, au moins, coopératifs.

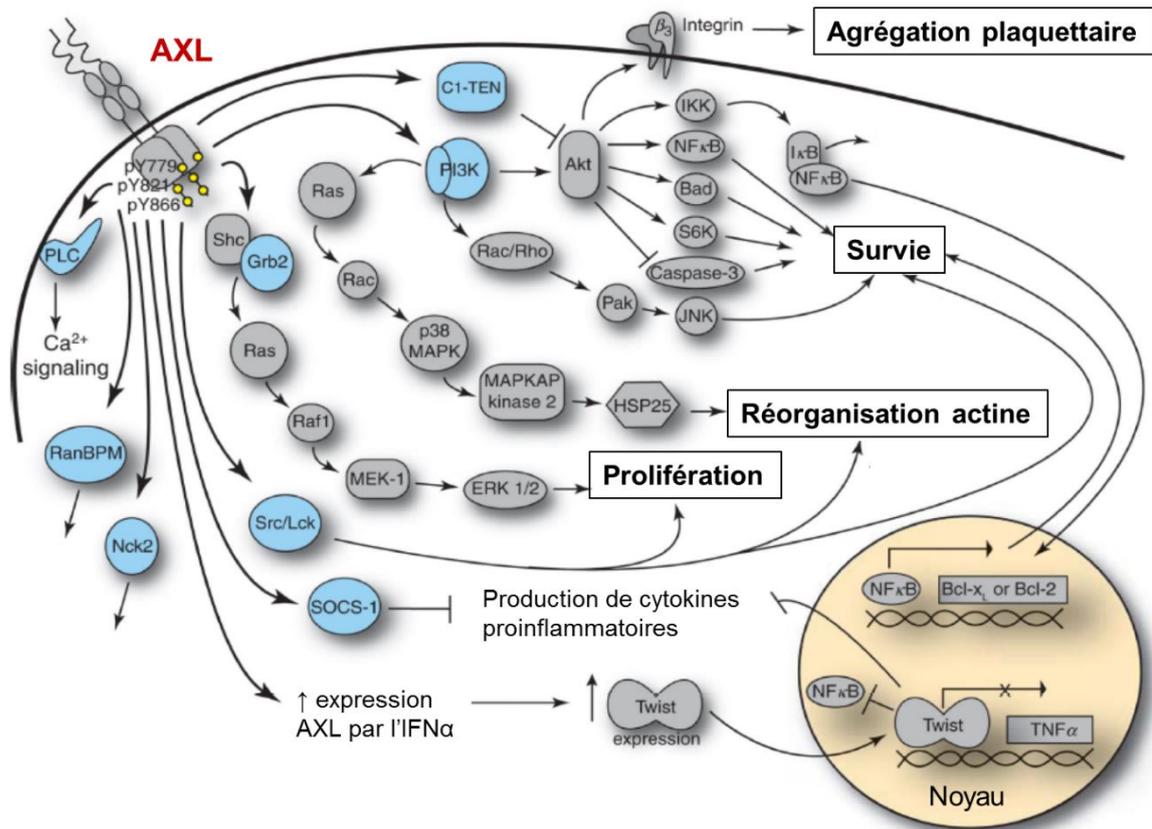


Figure 13 : Signalisation en aval de l'activation d'AXL. Les molécules en bleu ont démontré leur interaction directe ou indirecte avec AXL, d'après Linger *et al.*, *Adv Cancer Research* 2008.³³⁶

3. Rôles des RTAM

a. Immunité innée

En vieillissant, les souris simple, double ou triple « knock-out » pour les RTAM développent des tableaux de maladies auto-immunes dont la gravité augmente avec le nombre de « knock-out ». Ces phénotypes sont dus à une accumulation de corps apoptotiques, combinée à une activation constitutive du système immunitaire.

Le rôle des RTAM dans la réparation tissulaire et la clairance des corps apoptotiques est particulièrement bien défini pour MERTK, dans le cadre du processus d'efferocytose par les macrophages. Ce rôle a été mis en évidence dans les souris *MERTK*^{-/-} qui présentent des rétinites pigmentaires puisque les cellules de l'épithélium rétinien ne peuvent plus ingérer les corps apoptotiques, induisant inflammation et dégénération rétinienne.³⁶⁴ La plupart des monocytes circulants n'expriment pas MERTK alors que la fraction tissulaire en exprime des niveaux élevés, stimulant les fonctions d'endocytose, supprimant la sécrétion pro-inflammatoire et polarisant les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire de type M2.³⁶⁵

Dans les cellules dendritiques, l'activation des « Toll-like Receptors » induit une réponse pro-inflammatoire qui doit être régulée. Les RTAM et particulièrement AXL semblent participer à cette régulation en interagissant avec le récepteur à l'IFN de type I, qui active STAT1 qui va lui-même induire la transcription de SOCS1, régulateur négatif de la réponse inflammatoire.³²⁸

Les RTAM sont donc des senseurs de l'environnement, permettant de moduler l'immunité innée en réponse à une quantité de corps apoptotiques, ils modulent les mécanismes pro- et anti-inflammatoires. Au-delà du processus d'efferocytose des macrophages et des cellules dendritiques, ils jouent un rôle dans une autre catégorie de cellules de l'immunité innée : les NK.

La spécificité des NK dans leur mécanisme de déclenchement de la cytotoxicité inclut, entre autres, la reconnaissance d'un signal de « soi manquant » dû à l'absence de molécule du HLA de classe I sur leurs cellules cibles. Ce signal final est le résultat de la sommation de signaux inhibiteurs et activateurs. Les souris TAM-déficientes ont un nombre de NK normal mais présentent un profond déficit dans leurs fonctions

effectrices : leur maturation terminale est déficiente. En effet, les CSM du microenvironnement hématopoïétique sécrètent les ligands des RTAM et l'activation de ces derniers, particulièrement de TYRO3, au sein de NK immatures, permet leur maturation terminale et l'acquisition de leurs fonctions effectrices.³⁶⁶ Inversement, dans les NK matures, inhiber les RTAM entraîne une augmentation des fonctions effectrices des NK, notamment anti-tumorale, probablement en bloquant l'activation NKG2D-dépendante par un signal inhibiteur RTAM-dépendant.³⁶⁷

Enfin, au cours de l'activation lymphocytaire T, le lymphocyte externalise des PtdSer et sécrète PROS1 : un pontage se fait entre les PtdSer à la surface du lymphocyte T, PROS1, et MERTK à la surface des cellules dendritiques à proximité, participant à la diminution de leur activation.³⁶⁸

Finalement, la balance qui existe entre activation et inhibition du système immunitaire est contrôlée par de nombreux checkpoints et les RTAM ont un rôle prépondérant dans ce système, à travers au moins 4 mécanismes : (1) déclenchement de l'efferocytose MERTK-dépendante, (2) polarisation anti-inflammatoire M2 des macrophages, (3) frein à l'activation des cellules dendritiques, et enfin (5) blocage de l'activation des NK matures.

b. Autres fonctions

Il a rapidement été constaté que les souris *GAS6*^{-/-} sont protégées contre les thromboses et présentent un défaut d'agrégation plaquettaire. En effet, les plaquettes expriment les 3 RTAM et chacun est nécessaire pour leur agrégation. La perte d'un TAM ou l'utilisation d'AXL soluble sont des facteurs protecteurs contre les thromboses d'autant que lors de leur activation, les plaquettes externalisent des PtdSer et relarguent du GAS6.^{369,370}

Enfin, AXL et GAS6 sont tous deux augmentés dans les cellules musculaires lisses vasculaires à la suite d'un traumatisme,³⁷¹ GAS6 sert alors de facteur chimiotactique pour les cellules exprimant AXL et les protège de l'apoptose.³⁷² Ces données suggèrent un rôle dans les pathologies cardiovasculaires, d'autant que GAS6 stimule l'expression des récepteurs « scavengers » qui captent le LDL cholestérol.

Le rôle d'AXL a enfin été évoqué dans de nombreux tissus, notamment dans l'hématopoïèse normale, car il est particulièrement surexprimé par les cellules médullaires CD34⁺,³⁷³ mais peu de données suggèrent actuellement un rôle évident dans ce contexte en dehors de l'érythropoïèse murine.

***In fine*, AXL est un RTK possédant des capacités de protéine d'adhésion et de senseur de son environnement. Par l'intermédiaire de son ligand canonique GAS6, il s'active suite à la réalisation d'un pontage avec des corps apoptotiques périphériques.**

Ses voies d'aval lui confèrent un rôle dans la survie et la prolifération cellulaire mais aussi dans la migration et l'efferocytose.

D'expression relativement ubiquitaire, les RTAM d'une manière générale, jouent un rôle majeur au sein du système immunitaire, notamment inné.

B. Fonctions physiopathologiques des RTAM en Oncologie

Le potentiel oncogénique des RTAM est apparenté à une régulation aberrante de leur expression ou de leur dégradation. Ce rôle fut immédiatement évident puisqu'ils ont tous été clonés à partir de cellules cancéreuses. Depuis, de très nombreux cancers ont démontré une expression ectopique ou une surexpression de RTAM, notamment AXL : poumons, utérus, foie, sein, ovaire, estomac, colon, prostate, thyroïde, rein, LAM, LMC, mélanome, ostéosarcome et glioblastome ; TYRO3 dans le myélome, et enfin MERTK dans les LAL, lymphome du manteau, mélanome, rhabdomyosarcome, estomac et prostate.³⁶⁴

1. Biologie des RTAM dans les cellules tumorales

Des mutations d'AXL ont été décrites dans les cancers du sein, des ovaires, mélanomes, colon, estomac, prostate, pancréas et enfin dans les adénocarcinomes et carcinomes épidermoïdes du poumon.³⁶⁴ Aucune mutation n'a été décrite dans les hémopathies, mais des amplifications sont fréquentes, entre autres dans la LMC dans laquelle la trisomie 19 est un évènement génétique classiquement associé à la transformation blastique.

AXL est en lien avec des processus cellulaires variés, incluant prolifération, invasion, adhésion, migration, modulation du système immunitaire, angiogenèse ; autant de rôles décrits dans le chapitre précédent dans différents systèmes cellulaires en condition physiologique.

Le rôle d'AXL dans la prolifération cellulaire est démontré dans de nombreuses cellules cancéreuses.³⁷⁴⁻³⁷⁶ Parallèlement à ses capacités pro-prolifératives, AXL joue un rôle majeur dans la capacité d'invasion de ces cellules,³²⁶ mais aussi dans leur capacité pro-métastatique : AXL est un acteur clé de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Ce programme biologique est observé dans plusieurs types de carcinomes et est associé (i) à la diminution de l'expression de protéines impliquées dans l'adhésion cellule-cellule, (ii) à l'augmentation de celles impliquées dans l'adhésion cellule-MEC, (iii) à la sécrétion de protéases qui dissocient les lames basales pour faciliter la migration cellulaire. Physiologiquement, ce programme est utilisé au cours de

l'embryogenèse et de la cicatrisation mais il est réactivé dans les cellules tumorales au stade précédant la dissémination métastatique.

Dans un modèle de tumeur de poumon, Byers *et al.* ont démontré que le gène le plus fortement surexprimé dans les cellules en transition épithélio-mésenchymateuse est AXL,³⁷⁷ au même titre que dans les cancers du sein et du pancréas.³⁷⁸ Inversement, son « knock-down » entraîne l'effondrement des facteurs de transcription impliqués dans cette transition épithélio-mésenchymateuse, tel que TWIST, mais aussi la réexpression des molécules d'adhésion cellule-cellule telles que les E-cadherines.

AXL serait aussi impliqué dans la « stemness » de certaines cellules cancéreuses, notamment dans les gliomes dans lesquels son niveau de transcription est dépendant de l'expression d'EZH2,³⁷⁹ lui-même connu comme facteur de « stemness » de ces cellules tumorales. Il existe globalement peu de données et aucune dans la « stemness » des hémopathies.

Enfin, un des rôles les plus importants d'AXL dans de nombreux modèles cancéreux reste sa capacité à soutenir la cellule cancéreuse à travers l'activation de voies anti-apoptotiques. Dans différents cancers et à différents stades, il est systématiquement corrélé à un mauvais pronostic.³⁶⁴ Son rôle a notamment été impliqué dans la survie des cellules cancéreuses dans des situations de stress cellulaire tels que privation en nutriments,²⁸¹ basses pressions en O₂,^{325,380} et exposition aux chimiothérapies.³³²

Dans un modèle de métastase osseuse de cancer de prostate, il a été démontré que les ostéoblastes réalisaient une interaction cellule-cellule grâce à l'annexine II, ce qui induisait l'augmentation d'AXL par un mécanisme non élucidé. Cette surexpression d'AXL, associée à la sécrétion de GAS6 par le microenvironnement médullaire, induisait, dans ce contexte spécifique, une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses et une résistance aux chimiothérapies.³⁸¹ L'expression d'AXL et son activation par GAS6 ont été impliqués dans de nombreux modèles tumoraux, que ce soit pour la résistance aux chimiothérapies conventionnelles dans les cancers du sein,³⁷⁸ du colon,³⁸² du poumon,³⁸³ mais aussi aux thérapies ciblées.

Les cancers du poumon « non à petites cellules » présentent des mutations activatrices de l'EGFR dans 10 à 15% des cas. Chez ces patients, un traitement par EGFR-ITK, l'erlotinib, est indiqué, mais les réponses sont de courte durée avec acquisition de mutations de résistance ou surexpression de MET. Néanmoins, 40% des résistances ne sont expliquées par aucun de ces mécanismes. Dans ces cas-là, GAS6 et AXL sont les gènes les plus fortement surexprimés, sans amplification ni mutation associée, avec activation des voies MAPK et PI3K/AKT. Inversement, le « knock-down » d'AXL ou son inhibition pharmacologique restaure la sensibilité aux EGFR-ITK.³⁸⁴

Cette surexpression d'AXL dans les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées a aussi été retrouvée dans d'autres modèles tumoraux : (i) dans les tumeurs stromales gastro-intestinales résistantes à l'imatinib, tumeurs dans lesquelles AXL semble devenir l'oncogène « driver » puisque l'expression de KIT est totalement éteinte,³⁸⁵ (ii) dans les LMC résistantes à l'imatinib,^{329,355} (iii) dans les cancers du sein ou de l'œsophage Her2⁺, résistants au lapatinib (inhibiteur de ErbB1 & 2),^{386,387} dans les cancers du poumon résistants au cetuximab (anticorps anti-EGFR).³⁸⁸

Au-delà, AXL a aussi été associé à des résistances impliquant des inhibiteurs de checkpoints immunitaires. Dans un modèle de cancer du sein résistant à une association de radiothérapie et anti-PDL1 ou anti-CTLA4, AXL était retrouvé particulièrement surexprimé. Son « knock-out » a permis une néo-expression du CMH par les cellules tumorales, le recrutement des cellules dendritiques et une augmentation du ratio lymphocytes T CD8⁺/T_{Reg} dans les tumeurs irradiées, permettant une meilleure réponse immunitaire anti-tumorale après radiothérapie.³⁸⁹ AXL fait aussi partie des gènes les plus surexprimés dans les mélanomes non répondeurs aux anti-PD1.³⁹⁰

In fine, AXL est impliqué dans de très nombreux processus cellulaires qui recouvrent près de la moitié de la nouvelle génération des « Hallmarks of Cancer » tels que « Sustaining proliferative signaling », « Avoiding immune destruction », « Activating invasion and metastasis », « Inducing angiogenesis » and « Resisting cell death ».³⁹¹

2. Biologie d'AXL dans les LAM

L'expression d'AXL a été décrite comme très élevée dans les cellules CD34⁺ médullaires normales, élevée dans les LAM et SMD, faiblement positive dans les monocytes circulants et dans la LMC en phase chronique, puis enfin négative dans les autres cellules sanguines normales et la LAL.³⁷³

Son implication dans la résistance des cellules de LAM à la chimiothérapie conventionnelle a été démontrée en 2008. AXL était effectivement surexprimé dans les cellules de LAM résistantes à la chimiothérapie d'induction et il était démontré que la chimiothérapie elle-même induisait cette surexpression. La stimulation de lignées exprimant AXL par GAS6 induisait une résistance aux traitements *in vitro*, parallèlement à une activation de la voie des MAPK et à une surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que BCL2 et BCLXL alors que l'exposition à un antagoniste annulait ce phénomène.³³² Finalement, l'expression d'AXL dans des cellules de LAM *ex vivo* a été corrélée à leur statut CD34⁺ et au niveau d'expression de BCL2 dans les mêmes échantillons.³⁹²

Dans une cohorte plus récente de LAM à caryotypes normaux, l'expression des RTAM et de GAS6 a été retrouvée dans 57%, 79%, 85% et 90% des échantillons médullaires de patients, respectivement pour AXL, TYRO3, MERTK et GAS6. AXL était particulièrement surexprimé dans la population CD34⁺CD38^{low} alors que GAS6 était plutôt exprimé au niveau des cellules stromales sur les coupes histologiques. Enfin, le niveau d'expression élevé d'AXL a été corrélé à un mauvais pronostic en termes de survie globale.²⁸¹ Dans une cohorte indépendante, une autre équipe démontrera que l'expression de GAS6 est associée à l'expression d'AXL et que le niveau d'expression du ligand est indépendamment associé à une survie sans rechute et une survie globale plus courtes. De plus, cette surexpression de GAS6 est corrélée à une surexpression de CXCL12 et de son récepteur CXCR4 par les cellules médullaires.³⁹³

De manière concomitante, deux études publiées dans *Blood* en 2013, ont exploré le rôle d'AXL dans la biologie cellulaire des cellules de LAM :

La première étude a démontré que la déplétion en GAS6 par un AXL-leurre entraîne (i) une inhibition de la prolifération blastique quel que soit le statut FLT3, ITD

ou WT, (ii) réenclenche la différenciation avec expression du CD11b et de myéloperoxydase, (iii) diminue la prolifération de tumeurs sous-cutanées, et (iv) diminue la dissémination leucémique dans un modèle de prise de greffe hématopoïétique au moins autant que le midostaurin, sans effet additif ou synergique néanmoins avec cet inhibiteur multi-kinase.³⁶¹

La seconde étude a démontré que l'IL-10 et le M-CSF, sécrétés par les blastes, éduquent les stromas à sécréter du GAS6, responsable d'une partie de leur effet protecteur envers les chimiothérapies conventionnelles. Parallèlement, ces travaux démontrent le rôle d'AXL dans la survie des cellules leucémiques exposées à une privation en sérum, qui, au même titre que les chimiothérapies cytotoxiques, induisent une surexpression du RTAM. Enfin, l'inhibition pharmacologique d'AXL par un ITK, le R428, restaure la sensibilité des blastes aux chimiothérapies conventionnelles *in vitro*, diminue la croissance de tumeurs sous-cutanées et exerce un effet combiné avec la doxorubicine.²⁸¹

Enfin, un troisième article, publié en 2015 dans *Leukemia*, démontre que le niveau de phosphorylation d'AXL est corrélé à la résistance aux FLT3-ITK dans les LAM FLT3-ITD et qu'AXL est impliqué dans cette résistance. Inversement, son inhibition pharmacologique sensibilise à nouveau les cellules leucémiques à deux FLT3-ITK, le quizartinib (AC220) et le midostaurin (PKC412).³⁹⁴

3. Stratégies d'inhibition d'AXL

Le rôle crucial d'AXL dans la biologie tumorale et dans la résistance aux traitements de nombreux modèles tumoraux ont rapidement fait considérer ce RTK comme une nouvelle cible thérapeutique. Trois stratégies d'inhibition ont été développées : des inhibiteurs de tyrosine kinase (AXL-ITK), des anticorps monoclonaux ciblant le récepteur lui-même et des AXL solubles visant la déplétion des ligands.

a. Inhibiteurs de tyrosine kinase anti-AXL

Le premier AXL-ITK développé a été le R428 ou BGB324 (BerGenBio AS). *A priori* très spécifique d'AXL, le BGB324 cible le domaine kinase d'AXL et inhibe son activation. Son activité est 10 à 100 fois plus spécifique d'AXL que toutes les autres TK en dehors de TIE2 (3 fois), FLT4 (5,5 fois) et FLT1-RET-ABL (9 fois). Largement étudié *in vitro* dans de nombreux modèles tumoraux, il est actuellement en phase d'étude clinique dans 6 essais enregistrés dans ClinicalTrials dont une phase 1/2 dans les LAM et SMD (NCT02488408) dans laquelle il est utilisé seul ou en association à de l'aracytine ou de la decitabine. Un second AXL-ITK spécifique est le TP-0903 (Tolero Pharmaceutical) en cours de développement pré-clinique.

Trois autres sont des doubles inhibiteurs AXL/MET, le BPI-9016M (Betta Pharmaceuticals Co. Ltd), le MGCD265 et le MGCD516 (Mirati Therapeutics Inc.) qui sont en cours d'essai clinique de phase 1 dans les tumeurs solides.

Le dernier est un double inhibiteur FLT3/AXL, l'ASP2215 ou gilteritinib (Astellas Pharma Inc.), dont les premiers résultats cliniques ont été publiés récemment et développés dans le chapitre I.D.3.b. « Les différentes classes d'inhibiteurs de tyrosine kinase ». Ce composé a montré une IC50 d'inhibition de la phosphorylation du FLT3 de 5 nM pour le FLT3-WT, entre 0,7 et 1,8 nM pour le FLT3-ITD dans les lignées MOLM14 ou BA/F3 transduites avec un FLT3-ITD, et enfin entre 17 et 33 nM en présence de plasma humain. Classé comme FLT3-ITK de type I, le gilteritinib est efficace sur les différentes mutations du FLT3, ITD et TKD, incluant les mutations « gatekeeper » type F691L nécessitant néanmoins une IC50 plus élevée pour être inhibée. Ces résultats ont été confirmés sur cellules primaires de patients rechutant sous FLT3-ITK de type quizartinib. Par ailleurs, il permet une inhibition de l'activation

d'AXL, sous réserve de doses 40 fois plus élevées que la dose minimale pour inhiber le FLT3, de l'ordre de 40 nM. Son efficacité a été démontrée sur des échantillons de LAM FLT3-ITD à la rechute, comparés aux échantillons des mêmes patients au diagnostic. Ceci peut être expliqué par une augmentation du ratio ITD/WT et éventuellement par une surexpression d'AXL dans ces cellules de LAM en rechute.

Enfin, contrairement aux midostaurin, quizartinib et crenolanib qui inhibent KIT, le gilteritinib ne permet une inhibition de ce dernier que pour des doses 100 fois plus élevées que pour le FLT3-ITD.¹⁷⁹ *In vitro*, à partir d'une lignée exprimant le FLT3-ITD de manière endogène (MV4-11), la dose de 10 nM permet une extinction de 99% du signal de phospho-FLT3 alors que la dose de 100 nM est nécessaire pour éteindre 78% du signal de phospho-AXL. Dans un modèle de tumeurs sous-cutanées, à partir de lignée leucémique FLT3-ITD MV4-11, greffées à des souris immunodéficientes, la dose minimale nécessaire pour obtenir une réponse complète est de 6 mg/kg/jour alors que la dose nécessaire pour obtenir une extinction profonde et durable de phospho-FLT3 et de phospho-STAT5 au sein des cellules tumorales est de 10 mg/kg/jour. Dans un modèle de souris greffées avec des MV4-11 avec prise de greffe hématopoïétique, la survie à 3 mois des souris traitées à la dose de 30 mg/kg/jour est de 100% contre 0% pour les souris non traitées.²¹¹ A l'heure actuelle, 3 essais cliniques de phase 3 sont en cours dans les LAM FLT3-ITD, contre placebo en maintenance post-allogreffe (NCT02997202), contre placebo en maintenance chez des patients en première RC non allogreffés (NCT02927262) et avec ou sans azacitidine chez des patients non éligibles pour une chimiothérapie intensive (NCT02752035).

De très nombreux composés sont dorénavant présentés comme AXL-ITK, il s'agit en règle générale d'inhibiteurs multi-kinase ciblant la plupart du temps MET, ABL ou VEGFR, entre autres. Ils ont récemment bénéficié d'une revue exhaustive de la littérature.³⁹⁵

b. Les récepteurs-leurres anti-ligands

Les molécules de piégeage cytokinique forment une nouvelle classe thérapeutique issue de la compréhension des mécanismes d'activation des RTK. L'objectif est de créer une protéine chimérique contenant l'ECD du RTK associé en règle générale au fragment Fc d'une immunoglobuline. Ces récepteurs-leurres ont déjà démontré leur capacité à inhiber l'activation de plusieurs récepteurs cytokiniques

tels que les récepteurs à l'IL-1, l'IL-4 et l'IL-6, avec des demi-vies particulièrement prolongées.³⁹⁶

Plusieurs AXL-leurres ont été développés et largement étudiés *in vitro* dans de nombreux modèles tumoraux dans les références discutées précédemment. Récemment, une nouvelle génération plus efficace a été obtenue et les expérimentations pré-cliniques ont démontré leur capacité à diminuer la prolifération de lignées de LAM, FLT3-ITD et WT. *In vivo*, ces molécules entraînent une profonde déplétion en GAS6 parallèlement à une diminution du volume de différents modèles tumoraux, métastatiques ou non. Elles permettraient par ailleurs un effet synergique avec les chimiothérapies conventionnelles.³²²

c. Les anticorps anti-AXL

La dernière approche de thérapie anti-AXL est relative aux anticorps monoclonaux spécifiques, dirigés contre l'ECD du RTK. Ces anticorps ont initialement été validés dans un modèle pré-clinique de cancer du pancréas. Ils entraînent une internalisation du récepteur, sans activation, puis sa dégradation. En aval, les voies MAPK et PI3K sont moins activées et, sur le plan fonctionnel, les cellules présentent une apoptose dose-dépendante et ont des capacités migratrices diminuées. Ces anticorps ont par la suite été validés sur modèles murins, en termes de greffes hétérotopiques sous-cutanées et orthotopiques, entraînant une diminution du volume tumoral dans les deux cas.³⁹⁷ Enfin, leur efficacité a été validée dans la LMC, dans laquelle ils restaurent, *in vitro*, une sensibilité au nilotinib dans des lignées primitivement résistantes.³⁵⁵ Récemment, son efficacité a été démontrée dans un modèle pré-clinique de cancer du sein.³⁹⁸

L'implication d'AXL dans les LAM est similaire à celle observée dans les autres modèles de cancer : il est impliqué dans la résistance aux chimiothérapies, incluant les FLT3-ITK.

Différentes stratégies d'inhibition sont actuellement à l'étude en Oncologie pour exploiter ce RTK comme cible thérapeutique.

OBJECTIFS

De nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires dans les LAM. Les mutations du récepteur FLT3 sont une cible particulièrement intéressante et de nombreux essais ont été réalisés ces dernières années testant des FLT3-ITK. Différents mécanismes de résistance ont émergé, incluant des mécanismes en lien avec le microenvironnement de la cellule leucémique.

Dans ce contexte, le RTK AXL est un candidat intéressant car il active des voies relatives à la survie cellulaire et son activation est maximale lorsqu'il est lié à un corps apoptotique. Il a par ailleurs été montré comme participant à la signalisation du FLT3 muté ou sauvage.

Son rôle dans la LAM est connu mais son rôle spécifique au sein du microenvironnement médullaire n'a jamais été étudié. L'objectif de cette thèse a donc été d'explorer, dans les LAM FLT3-ITD :

- ✓ La capacité d'AXL à induire une résistance particulièrement soutenue au sein de la niche hématopoïétique, modélisée par des co-cultures avec des cellules stromales, des cytokines et de basses pressions en O₂,
- ✓ La pertinence du FLT3-ITK gilteritinib (ASP2215), double-inhibiteur FLT3/AXL, comparée au quizartinib (AC220) pour atteindre les cellules au sein de leur microenvironnement médullaire,
- ✓ La pertinence d'un anticorps monoclonal anti-AXL en association avec du quizartinib pour atteindre les cellules au sein de leur microenvironnement médullaire.

RESULTATS

Article 1

Microenvironment favors FLT3-ITD AML resistance to FLT3-TKI through hypoxia- and STAT5- dependent upregulation of AXL

Pierre-Yves Dumas,* Cécile Naudin,* Séverine Martin-Lannerée, Sophie Castede, Brigitte Izac, Luana Casetti, Olivier Mansier, Benoît Rousseau, Alexandre Artus, Melody Dufossée, Alban Giese, Pierre Dubus, Arnaud Pigneux, Vincent Praloran, Arnaud Villacreces, Amélie Guitart, Noël Milpied, Isabelle Vigon, Vanessa Desplat, Isabelle Dusanter-Fourt, and Jean-Max Pasquet

Soumis à *Blood* le 10 juillet 2017

Synthèse de l'article 1

Ce travail a été fait en collaboration avec les Drs. C. Naudin et I. Dusanter-Fourt (Equipe « Régulateurs du maintien des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques » de l'unité INSERM U1013 - CNRS UMR8104, Institut Cochin, Université Paris Descartes, Paris, France).

Dans un premier temps, nous avons montré le rôle anti-apoptotique de différentes lignées stromales (OP9 et MS5) sur trois lignées de LAM FLT3-ITD (MV4-11, MOLM-13 et MOLM-14) exposées au FLT3-ITK quizartinib. Nous avons mis en évidence que cette protection stromale était dépendante de contacts cellule-cellule et de facteurs solubles, qui permettaient le maintien de l'activation de STAT5 dans les cellules leucémiques, malgré la présence du quizartinib.

Par la suite, nous avons démontré qu'AXL était parmi les gènes les plus down-régulés, à l'échelle transcriptionnelle, en l'absence de STAT5, dans des progéniteurs hématopoïétiques normaux et dans les lignées de LAM FLT3-ITD. Nous avons démontré que l'inhibition d'AXL par un AXL-ITK, le R428, permettait de restaurer une apoptose quizartinib-dépendante des cellules FLT3-ITD, malgré la présence de stroma. Enfin, nous avons démontré, par l'utilisation d'un récepteur-leurre anti-ligand et par « knock-down » de GAS6 dans les lignées stromales, que la déplétion en GAS6 induisait la perte d'une partie de l'effet protecteur des CSM contre le quizartinib.

Au vu de la transcription STAT5-dépendante d'AXL, nous avons exploré le rôle des cytokines activatrices de STAT5 dans ce modèle. Nous avons démontré que l'IL-3, la TPO, et le GM-CSF étaient capables d'induire une surexpression d'AXL dans des progéniteurs hématopoïétiques normaux, dans des lignées de LAM cytokines-dépendantes (UT-7) et dans les lignées de LAM FLT3-ITD. Enfin, nous avons démontré la présence d'un « STAT5 Responsive Element » au niveau de l'intron 16 du gène d'AXL, ainsi que sa capacité à co-immunoprécipiter avec STAT5 et avec l'ARN polymérase II. Enfin, nous avons confirmé que la co-culture des cellules de LAM avec les cellules stromales induisait bien une surexpression protéique d'AXL. Nous avons donc démontré, pour la première fois, que STAT5 régule AXL par un mécanisme cytokine-dépendant.

Par la suite, nous avons montré que la sensibilité au quizartinib était diminuée dans des conditions de basses pressions en O₂, alors que la sensibilité au R428 était augmentée, particulièrement lorsque les cellules FLT3-ITD étaient co-cultivées sur les lignées stromales. Cette plus grande sensibilité à un AXL-ITK suggérait un rôle particulier du RTK dans ce contexte de niche hématopoïétique et nous avons effectivement démontré qu'AXL était surexprimé lorsque les cellules de LAM FLT3-ITD étaient cultivées en conditions hypoxiques à 1% d'O₂. L'ensemble de ces mécanismes, cytokines-dépendant et hypoxie-dépendant suggérait un rôle clé d'AXL au sein de la niche hématopoïétique.

Nous avons donc souhaité valider notre modèle par des expérimentations *in vivo*. Nous avons généré une lignée de LAM FLT3-ITD « AXL knock-down » (MV4-11 shAXL) qui ne présentait, *in vitro*, aucune modification en termes de prolifération ou de sensibilité au quizartinib lorsqu'elle était comparée à la lignée contrôle (MV4-11 contrôle). Nous avons réalisé des xénogreffes sous-cutanées avec ces lignées sur les flancs de souris immunodéprimées. Les tumeurs issues des MV4-11 shAXL ou MV4-11 contrôle présentaient des index de prolifération identiques et des sensibilités au quizartinib similaires. A l'issue de l'obtention de la rémission complète, aucune différence en termes de délai de rechute ou d'index de prolifération à la rechute ne fut mise en évidence. Inversement, dans un modèle de LAM FLT3-ITD avec prise de greffe hématopoïétique, nous avons démontré que les cellules « AXL knock-down » étaient beaucoup plus sensibles au traitement par quizartinib. Enfin, la LAM FLT3-ITD « AXL knock-down » développée par les souris était moins agressive puisque les souris greffées avec les cellules MV4-11 « shAXL » avaient une survie spontanément plus prolongée que les souris greffées avec les MV4-11 « contrôle », indépendamment de tout traitement.

Ces résultats sont donc en faveur d'un rôle d'AXL dans la protection des LAM FLT3-ITD contre le quizartinib, qui se dévoile spécifiquement dans le contexte de la niche hématopoïétique, puisque ce dernier y est positivement régulé par une signalisation cytokines-dépendante et par de basses pressions en O₂.

L'article issu de ces travaux a été soumis à *Blood* mais les éditeurs souhaitent qu'il soit complété par des expérimentations sur cellules primaires de LAM. Ces expérimentations sont en cours. La version de l'article soumis avant intégration des données *ex vivo* est présentée ci-après.

Microenvironment favors FLT3-ITD AML resistance to FLT3-TKI through hypoxia- and STAT5- dependent upregulation of AXL

Pierre-Yves Dumas,^{1,2,9#} Cécile Naudin,^{3#} Séverine Martin-Lannerée,³ Sophie Castede,^{1,9} Brigitte Izac,³ Luana Casetti,³ Olivier Mansier,⁴ Benoît Rousseau,⁵ Alexandre Artus,³ Melody Duffossée,¹ Alban Giese,⁶ Pierre Dubus,^{7,8,9} Arnaud Pigneux,^{1,2,9} Vincent Praloran,^{1,8,9} Arnaud Villacreces,¹ Amélie Guitart,¹ Noël Milpied,^{1,2,9} Isabelle Vigon,¹ Vanessa Desplat,^{1,9} Isabelle Dusanter-Fourt,^{3*} and Jean-Max Pasquet^{1*}

Authors' affiliations

1. INSERM U1035, Université de Bordeaux, Bordeaux, France
2. CHU Bordeaux, Service d'Hématologie Clinique et Thérapie cellulaire, F-33000, Bordeaux, France
3. INSERM U1016, CNRS UMR8104, Institut Cochin, Université Paris Descartes, Paris, France
4. INSERM U1218, Université de Bordeaux, Bordeaux, France
5. Service Commun des Animaleries, Animalerie A2, Université de Bordeaux, France
6. UMS 005 TBM Core, Plateforme d'histopathologie expérimentale, Université de Bordeaux, France
7. INSERM U1053, Université Bordeaux, Bordeaux, France
8. CHU de Bordeaux, Service de Biologie des Tumeurs, Bordeaux, France
9. Université de Bordeaux, Bordeaux, France

* I.D.-F. and J.-M.P. are co-senior authors.

P.-Y.D. and C.N. contributes equally to this work.

Corresponding authors

Dr Jean-Max Pasquet, INSERM U1035, Université de Bordeaux, France

Mail : jean-max.pasquet@u-bordeaux.fr

Dr Isabelle Dusanter-Fourt, INSERM U1016, Université Paris Descartes, France

Mail : isabelle.dusanter@inserm.fr

Keywords

Acute myeloid leukemia, FLT3-ITD, AXL, microenvironment, cytokines, hypoxia, stromal cells, quizartinib, R428, STAT5

Short title

Microenvironment, AXL and FLT3-ITD AML resistance

Words

Text words: 3996

Abstract words: 157

Number of figures: 5

Number of references: 67

Key points

- STAT5-activating cytokines and low O₂ concentration, hallmarks of hematopoietic niche, upregulate AXL expression and activity
- AXL inhibition eradicates FLT3-ITD AML resistance to targeted therapy in the hematopoietic niche *in vivo*

Abstract

Internal tandem duplication in *Fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3-ITD) is the most frequent mutation observed in acute myeloid leukemia (AML), and correlates^{52,5351,52} with poor prognoses. FLT3 tyrosine kinase inhibitors (FLT3-TKI) have been promising for therapeutic strategy but clinical trials have revealed rarely long-lasting remission with persistent leukemic cells present in the bone marrow. In this paper, we show that a hematopoietic niche microenvironment protects FLT3-ITD AML cells from FLT3-TKI through convergent up-regulation of AXL expression and activity. Cytokine-dependent activation of STAT5 enhances AXL gene transcription and expression, while low O₂ concentration up-regulates AXL protein levels. Moreover, stromal cytokines such as thrombopoietin or interleukin-3 directly activate AXL. RNA interference-based inhibition of AXL expression in FLT3-ITD AML cells allowed a selective purge of leukemic cells within their microenvironment when combined with FLT3-TKI in immuno-compromised mice. Altogether, our data support a strategy of combined FLT3- and AXL-TKI therapy to eradicate FLT3-ITD AML cells, including those protected by the hematopoietic niche.

Introduction

Internal tandem duplication (ITD) in *Fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3) gene is the most frequent mutation found in acute myeloid leukemia (AML).^{1,2} Although FLT3-ITD mutation is a late event in leukemogenesis,^{3,4} it is considered to be an important target for the disease.^{5,6} Indeed, clinical trials have shown that FLT3-ITD confers a poor prognosis in adult AML patients,^{1,7} and its frequent occurrence at relapse suggests that FLT3-ITD AML-initiating cells are key targets for long-lasting remission.⁸

FLT3 is a class III tyrosine kinase (TK) receptor that is well expressed in hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) and which strongly activates PI3K/AKT and MAPK pathways upon ligand binding.⁹ FLT3-ITD mutation induces constitutive activity in the receptor, and has been associated with a distinctive pattern of activated signaling pathways, the principal change being the activation of the transcription factor STAT5.^{10,11} FLT3 tyrosine kinase inhibitors (FLT3-TKI), developed as ATP-competitive inhibitors, have been initially tested in clinical trials in monotherapy, with variable benefits according to disease heterogeneity. In brief, these treatments induce a hematological improvement associated with a clearance of peripheral blasts.¹²⁻¹⁵ However, clearance of bone marrow (BM) blasts is rather poor, with little noticeable cell apoptosis, but instead cell-cycle arrest and terminal differentiation.¹⁶ Complete remissions are rare and of short duration, with the emergence of resistance related to several mechanisms. Intrinsic mechanisms include (i) the activation of new bypass signaling pathways that improve the survival rate of AML cells,¹⁷⁻¹⁹ and (ii) activation loop or gatekeeper mutations, which induce acquired resistance to FLT3-TKI.⁵ Extrinsic mechanisms include stromal FLT3-ligand overproduction,²⁰ along with other stroma-related protection of BM AML cells through both cell-cell interactions and the secretion of various cytoprotective factors.^{21,22}

AXL belongs to the TAM receptor family, which also includes TYRO3 and MER. It is activated by a process of dimerization upon binding with its ligand, Growth Arrest-specific 6 (GAS6). This GAS6/AXL pathway contributes to various biological processes, such as cell growth, survival, invasiveness, chemotaxis, apoptotic cell clearance and immunity.²³ AXL is ectopically or over-expressed in a wide variety of cancers, and has always been associated with a poor prognosis.²³ Our team, among others, have shown that AXL promotes both innate and acquired resistance to conventional and targeted therapies in a wide variety of neoplasia.²⁴⁻²⁷ Despite

frequent AXL overexpression in many solid tumors, genetic mutation and amplification of the AXL gene has never been reported for AML,²⁸ but AXL and GAS6 levels have been related to poor outcomes.^{29,30} Moreover, an AML cell-driven education of stromal cells to secrete GAS6 has been shown to foster AML resistance to conventional chemotherapies.²⁹ The inhibition of AXL activity by recently developed AXL-TKIs, or by GAS6 trapping through decoy receptors, decreases leukemic cell growth, and weakens constitutive FLT3 phosphorylation. Taken together, these data have emphasized the potential contribution of AXL to FLT3-ITD-dependent leukemogenesis.^{31,32}

AXL expression and function have long been shown to be modulated by stress, severe nutrient deprivation and low oxygen (O₂) concentrations, as reported in solid tumors.³³⁻³⁵ Such characteristics are quite similar to those observed within the AML-initiating cell microenvironment, *i.e.* the hematopoietic niche. In this work, we aim to decipher how this microenvironment protects FLT3-ITD AML blasts from FLT3-TKI. Our work provides evidence that selective cytokines and low O₂ concentrations enhance AXL expression and activity, which selectively contributes to FLT3-ITD AML cell resistance to FLT3-TKI within their hematopoietic niche.

Methods

Cell culture and primary cells

Cell lines were cultured in a RPMI1640 or α MEM medium, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin. The UT7-mpl cell medium was supplemented with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, 2.5 ng/ml), as previously described.³⁶ UT7-mpl cells were pre-incubated for 18 hours (hrs) in the absence of GM-CSF, before being activated by cytokines. Where indicated, cells were cultured with vehicle or AXL-Fc chimeric proteins (R&D Systems), AC220 (LC laboratories), R428 (Selleckchem), Ly294002, pimozone and JAK inhibitor-1 (Calbiochem). Hypoxia was induced by incubating cells in 1% O₂ chamber (BioSpherix). Human cord blood (CB) units were collected according to institutional guidelines. CD34⁺ were purified and cultured in a four-cytokine-supplemented serum-free IMDM medium, as previously described.³⁷

Immunoblotting and immunoprecipitation

Total cell lysates were prepared by incubating cells for 30 min at 4°C in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 10% Glycerol) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche). Immunoprecipitation (IP) was performed with 500 μ g proteins and 5 μ g of antibody then IP or 20-50 μ g of whole cell lysates were loaded onto SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose or PVDF membranes (Amersham-Biosciences). Detection was performed using ECL (Amersham-Biosciences). Images were captured using a CCD camera, Fuji-LAS4000 (Fujifilm). The antibodies are listed in Supplemental Table 1.

Cell apoptosis

Cell apoptosis was assessed using an APC-conjugated Annexin V labeling detection kit coupled to flow cytometry and BDFACSDIVA™ software (Bioscience).

Chromatin immunoprecipitation assay

Cells (5×10^6) were stimulated for 30 min with or without thrombopoietin (TPO) (20 nM), washed and cross-linked with 1% formaldehyde (10^6 cells/ml) at room temperature for 5 min before adding glycine (0.125 M). Cells were processed as previously described,³⁸ more details about these methods are available in the supplemental data.

AXL, GAS6 and STAT5 gene expression knock-down using shRNA

Lentiviral particles were prepared as previously described,³⁷ more details about these methods are available in the supplemental data.

Animal models for *in vivo* studies

NOD Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ immunodeficient mice (NSG) were bred at the University of Bordeaux's animal facility. Animals were included in protocols at eight weeks old and were monitored weekly for body weight. For subcutaneous xenografts, prior to implantation cells were resuspended in 25% Matrigel (BDBiosciences) and 75% culture medium without FCS. For hematopoietic engraftment, female NSG mice were pretreated with intraperitoneal injections of busulfan (Fabre) 20 mg/kg/day for two days, followed by an intravenous injection of 10^6 empty vector (MV4-11 Ctrl) or shAXL (MV4-11 shAXL) luciferase transduced cells (10^6 cells/100 μ L). More details about these methods are available in the supplemental data.

Statistical analyses

All analyses were performed using GraphPad Prism software. Unless otherwise indicated, data are presented as the mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). Statistical significance was calculated by a two-tailed Student's T-test unless otherwise stated. Differences with p values < 0.05 were considered statistically significant with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, non-significant.

Results

Stromal cells protect FLT3-ITD AML from TKI-dependent apoptosis coincident with STAT5 activation

We first studied three FLT3-ITD AML cell lines and investigated the potential protective effect of two stromal cell lines on cells exposed to AC220, a competitive ATP FLT3-TKI. When co-cultured with either OP9 or MS5 stromal cells, MV4-11, MOLM-13 and MOLM-14 cells showed a decreased AC220-induced apoptosis, as compared with AML cells without stroma (Figure 1A and supplemental Figure 1). Co-cultures were further performed with a transwell, separating stromal cells from FLT3-ITD AML cells to avoid cell-cell contact. Again, stromal cells protected the FLT3-ITD AML cells from AC220-dependent cell apoptosis, although protection was weaker (Figure 1B).

These results suggest that protection by stroma from AC220-induced FLT3-ITD AML cell apoptosis was dependent on both cell-cell contact and diffusible factors.

To decipher the molecular mechanisms of stromal protection, we analyzed signaling pathways that were activated in FLT3-ITD AML cells with AC220 treatment in the presence or absence of stromal cell co-culture (Figure 1C). Besides inhibiting FLT3 phosphorylation, AC220 decreases ERK phosphorylation and AKT phosphorylation, as previously described. No difference was observed in ERK expression, T₂₀₂/Y₂₀₄ERK phosphorylation, AKT expression or Ser₄₇₃AKT phosphorylation, with or without stroma co-culture. However, an analysis of STAT5 expression and activation showed a sustained Y₆₉₄STAT5 phosphorylation of FLT3-ITD AML cells when cells were co-cultured with OP9 cells in the presence of FLT3-TKI, whereas – as expected – Y₆₉₄STAT5 phosphorylation was inhibited by AC220 in the absence of stroma. Similar results were obtained with MOLM-14 cells co-cultured with MS5 stromal cells (data not shown).

These data suggest that the stroma provided protection to FLT3-ITD AML cells through sustained STAT5 activation, independent of FLT3-ITD activity.

AXL contributes to FLT3-ITD AML cell survival through GAS6-dependent and -independent pathways

Using an RNA interference based strategy, our team has previously shown that STAT5 mediates crucial stroma-derived signals that contribute to HSPC maintenance *in vitro*.³⁷ We searched for STAT5 regulated genes by conducting a comparative large-scale genome expression analysis of STAT5 knocked down (KD) and control in normal human primitive CD34⁺CD38⁻ HSPC. AXL was among the top-ranked genes that were the most down-regulated upon STAT5 loss (Supplemental Table 4). We confirmed these observations and showed that AXL mRNA and proteins were both decreased in STAT5 KD HSPC (supplemental Figure 2). Similarly, we observed a down-regulation of AXL expression in STAT5 KD FLT3-ITD AML cell lines (Figure 2A). These data indicated that STAT5 up-regulates AXL expression in normal HSPC and AML cells. Since stromal co-cultures enhanced STAT5 activation of AML cells, we assessed its effects on AXL expression. We found that stromal cells enhanced AXL expression of AML cells (Figure 2B). We thus analyzed the role of AXL on AML cell survival. We used a well-characterized and clinically investigated AXL-TKI, R428, to inhibit AXL activity and analyze its effects on FLT3-ITD AML cell survival. First, we determined the AC220 and R428 minimal effective dose (MED) to induce apoptosis after 48 hrs of incubation without stromal cell, with the aim of achieving the greatest reduction in off-target effects of these TKI (supplemental Figure 3). AC220 MED was 1-3 nM dependent on FLT3-ITD AML cell lines, whereas R428 MED was 0.3 μ M for the three cell lines. These MED enabled us to observe that AXL and FLT3 co-inhibition induced a much higher level of apoptosis than a single treatment (Figure 2C). These results indicate that AXL contributes to basal FLT3-ITD AML cell survival; they further suggest that AXL activity sustains FLT3-ITD AML cell survival independently of FLT3-ITD activity, and is involved in FLT3-TKI resistance.

AXL activation depends on the binding of its ligand GAS6, for which autocrine and paracrine activities have been reported in multiple cell contexts, including AML.²⁹ Although leukemic cells are known to secrete GAS6, stromal cells were shown to secrete larger amounts of GAS6 upon interaction with AML cells. Having shown that AXL activity sustains FLT3-ITD AML survival, we analyzed the contribution of GAS6 to the protective effect of stromal cells on AC220-dependent AML cell apoptosis. Indeed, the stromal protection of FLT3-ITD AML cells was significantly reduced, yet not

suppressed, when cells were co-incubated with AXL-Fc, a GAS6-neutralizing molecule (Figure 2D), or when AML cells were co-cultured with GAS6 KD stromal cells (Figure 2E and supplemental Figure 4). These data indicate that AXL was at least partly activated through paracrine secretion of GAS6 by the stromal cells. Interestingly, however, the inhibition of AXL activity by R428 tended to more strongly suppressed the stromal protection of AML cells, as compared to GAS6-inhibition by AXL-Fc or GAS6 KD stromal cells. Altogether, these data suggest that stromal cells protect FLT3-ITD AML cells from AC220-dependent apoptosis by both GAS6-dependent and -independent signaling pathways.

STAT5-activating cytokines trigger AXL expression and activity

We wished to determine whether stroma mediates GAS6-independent AXL activation. Stromal cells express and secrete a broad range of diffusible factors. Among these are well-known activators of STAT5, such as the cytokines GM-CSF, Interleukin-3 (IL-3) and TPO. We wondered whether such STAT5-activating cytokines induce up-regulation of AXL in AML cells. As a first step, we used UT7-mpl AML cells that are highly sensitive to GM-CSF and TPO for their growth and survival.³⁶ As shown in Figure 3A, GM-CSF and TPO enhanced expression of AXL within a few hours of cytokine treatment. In the presence of the STAT5 inhibitor pimozide (pi) and JAK2 inhibitor-II (ji), GM-CSF and TPO no longer up-regulated AXL expression, whereas inhibition of the PI3K/AKT pathway by Ly294002 (ly) had no effect (Figure 3B). These results indicate that cytokines up-regulate AXL expression through a STAT5-dependent signal. In the meantime, we observed that AXL activity, assessed by Tyr⁷⁷⁹ AXL phosphorylation and global Tyr phosphorylation of AXL immunoprecipitates (Figure 3B-C), was also induced by cytokine treatment. Such an activation was observed quite shortly (≤ 1 hr) after the addition of cytokine, well before any detectable cytokine-dependent up-regulation of AXL expression (Figure 3C). To preclude any cell line artefacts, we further analyzed cytokine actions in primary CD34⁺ HSPC from healthy donors. We observed that STAT5-activating cytokines such as IL-3 and TPO up-regulated AXL expression, as well as AXL Tyr-phosphorylation, whereas incubation in the presence of FLT3 ligand, which did not activate STAT5, had no effect (supplemental Figure 5A). These data indicate that aside from GAS6, other extracellular messages, such as the STAT5-activating cytokines present in the

microenvironment, can up-regulate AXL expression and activity in AML cells and normal HSPC.

We then assessed the contribution of cytokine-dependent STAT5 signaling on AXL transcription. STAT transcription factors bind to TTCN3GAA SRE motifs on their target genes. We screened the human AXL genomic sequence for SRE and identified one that was conserved among species including rats, mice and humans, located within intron 16 (data not shown). Long-range chromatin interactions associated with RNA polymerase II (RNAPol_{II}) activity have recently uncovered widespread promoter-enhancer interactions that selectively contribute to cell-specific transcription and functions.³⁹ Oligonucleotide pull-down assays showed that this conserved intronic SRE was functional, since it did bind cytokine-activated STAT5 as efficiently as the control canonical SRE (ONc) from IRF1 promoter sequence (supplemental Figure 5B). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed to determine whether this AXL SRE binds STAT5 and contributes to regulating AXL gene expression *in vivo*. STAT5 ChIP showed that cytokine triggered strong STAT5 binding to AXL gene sequence selectively (Figure 3D). Coincident with STAT5 binding, cytokine enhanced the recruitment of RNAPol_{II} to the AXL gene, as assessed by ChIP (Figure 3E). These data indicate that cytokine-activated STAT5 binds and up-regulates AXL promoter activity.

FLT3-ITD AML cells are characterized by a large retention of FLT3-ITD in the endoplasmic reticulum, where STAT5 is activated.¹¹ These cells are known to express cytokine receptors at their surface, where activity has remained ill-defined.⁴⁰⁻⁴² We wondered whether cytokines could still mediate STAT5 activation and AXL up-regulation in FLT3-ITD AML cells. As shown in Figure 3F, cytokines such as IL-3 or TPO activated STAT5 phosphorylation in FLT3-ITD AML cells, which was detected even in the presence of FLT3-TKI. This activation correlated with an increased AXL expression that was observed in the absence and presence of FLT3-TKI treatment (Figure 3G).

Taken together, our data indicate that stromal cytokines activate STAT5 in AML cells, which up-regulates AXL independently of FLT3-ITD activity.

Low O₂ concentration enhances FLT3-ITD AML cells resistance to TKI coincident with increased AXL expression

In solid tumors, AXL's protective role is mainly activated under stress conditions frequently associated with metastatic disease, situations where tumor cells are under severe nutrient and O₂ deprivation. Hence, we investigated the contribution of low O₂ levels (1% O₂), so-called hypoxia, on FLT3-ITD AML cell survival and resistance to FLT3-TKI treatment. In the absence of stroma, hypoxia limited FLT3-TKI-dependent apoptosis, as compared to normoxia (Figure 4A). These observations suggest that the survival of FLT3-ITD AML cells could be less dependent on FLT3-ITD activity under hypoxia. Consequently, we analyzed the FLT3 and AXL expression of AML cells and observed that hypoxia enhanced AXL expression, whereas FLT3 expression was unaffected (Figure 4B). As AXL activity contributed to FLT3-ITD cell survival (see Figure 2C), we wondered whether the AXL-TKI, R428, reversed the AML cell protection brought about by hypoxia. As shown in Figure 4C, we observed that the FLT3-ITD AML cell apoptosis induced by R428 treatment was higher under hypoxia when compared to normoxia, particularly when AML cells were co-cultured with stroma. As a whole, these results indicate that AXL pro-survival activity in AML cells was strengthened under hypoxia, when compared to normoxic conditions.

AXL mediates microenvironment-dependent resistance of FLT3-ITD AML cells to TKI treatment *in vivo*

Having shown that AXL mediates stromal protection against TKI-dependent apoptosis of FLT3-ITD AML cells *in vitro*, we analyzed the contribution of AXL to microenvironment-dependent protection against FLT3-TKI *in vivo*. To better investigate the role of AXL on a long timescale, we generated stable AXL KD FLT3-ITD AML cells through lentivirus-mediated RNA interference (supplemental Figure 6A). Furthermore, such a model allowed us to alleviate any putative off-target effects of AXL chemical inhibitors or AXL decoy receptors.

We first evaluated the *in vivo* activity of AC220 in the subcutaneous xenograft tumor model using control (MV4-11 Ctrl) or AXL KD (MV4-11 shAXL) AML cells. The subcutaneous implantation of these cells into immunodeficient NSG mice resulted in the growth of solid tumors. No difference in tumor growth between MV4-11 Ctrl or MV4-

11 shAXL cells was observed under these conditions when assessing tumor volume (Figure 5A), and also primary tumor weights at necropsy (supplemental Figure 6B). After 21 days, when tumors reached 300-500mm³, half of the mice received AC220 by daily oral gavage (5 mg/kg/day). The treatment was well tolerated, as indicated by the absence of an impact on whole body weight (supplemental Figure 6C). The inhibition of FLT3-ITD with AC220 resulted in a complete regression of the tumors within 14 days. We did not observe any difference between MV4-11 Ctrl and MV4-11 shAXL in terms of tumor growth or response to treatment. The daily administration of AC220 was ceased after full tumor regression. This led to regrowth of all tumors 12 days after the discontinuation of AC220, without any difference in time to relapse between MV4-11 Ctrl and MV4-11 shAXL-injected mice. Furthermore, no noticeable difference in tumor volumes was observed post relapse (Figure 5A). Similar tumor weights at necropsy confirmed these last observations (supplemental Figure 6B).

The absence of any difference in subcutaneous tumor growth between MV4-11 Ctrl and MV4-11 shAXL injected animals led us to test the efficacy of AC220 in a more pathophysiological setting, where AML cells could settle in their natural microenvironment within BM. MV4-11 Ctrl and MV4-11 shAXL cells, stably expressing the firefly luciferase gene, were xenografted by vein injection, and leukemic cell engraftment was analyzed by bioluminescence imaging (BLI). BLI indicated that injected AML cells preferentially homed in BM, but we did not observe any difference in engraftment between MV4-11 Ctrl and MV4-11 shAXL cells after 7 days (supplemental Figure 7). Half of the mice were treated with AC220 for 7 days, and response to treatment was assessed by second BLI at day 14. A similar tumor progression was observed for MV4-11 Ctrl and MV4-11 shAXL cells in the untreated cohort (Figure 5B). In contrast, quite a strong decrease in total bioluminescent signal, which assesses leukemic dissemination, was observed in response to AC220 in MV4-11 shAXL-mice selectively, as compared to controls (Figure 5B). Noticeably, in the absence of TKI treatment, the overall survival of MV4-11 shAXL-mice was significantly longer than controls, indicating that MV4-11 shAXL cells showed weakened tumorigenic potential (Figure 5C).

In new, independent experiments, we performed the same sequence of conditioning, engraftment and treatment, though BLI was performed on femurs and tibias *ex vivo* at necropsy. We once again observed a decreased bioluminescent signal

in bones from MV4-11 shAXL-engrafted mice compared to bones from MV4-11 Ctrl-engrafted mice, whereas no difference was observed among injected animals in the absence of FLT3-TKI treatment (Figure 5D). At necropsy, an immunohistochemistry analysis of BM to trace human cells showed the presence of similar amounts of MV4-11 Ctrl and shAXL cells in untreated mice. In the AC220-treated cohort, we found much lower amounts of cells in MV4-11 Ctrl engrafted BM-mice compared to the untreated cohort, and finally no human cell was detected in BM from MV4-11 shAXL-engrafted mice upon AC220 treatment (Figure 5E).

Altogether, these results showed that AXL plays a major role in FLT3-ITD AML cell resistance to AC220 treatment *in vivo*, in the context of the hematopoietic microenvironment, selectively.

Discussion

Our study reveals that the hematopoietic niche provides selective intrinsic protection of AML cells against FLT3-TKI, by enhancing AXL receptor expression through both STAT5-mediated cytokines and its characteristic hypoxic environment, but also AXL activity through both GAS6 and cytokines expression/secretion by stromal cells. Microenvironment was already known to favor AML cell resistance to treatment through CXCL12-CXCR4 signaling,⁴³⁻⁴⁴ and adhesion molecules such as CD44 and selectins.^{45,46} Bone marrow vasculature has also been involved in AML progression and resistance through VEGF,^{47,48} and angiopoietins/TIE2 signaling.^{49,50} More recently, FLT3 ligand and FGF1/2 were similarly identified as protective molecules against FLT3-TKI *in vitro*.⁵¹ Stroma had also been shown to sustain AML cell resistance to treatment through activation of the AXL receptor, upon AML cell-dependent education of stroma to secrete the AXL ligand GAS6 *in vitro*. This axis has been related to poor outcomes linked to GAS6-dependent pro-survival activity.²⁹ Such a protective role has been observed in conventional chemotherapies, as well as TKI.^{29,31,21} We can now provide evidence that aside from GAS6, a broad range of microenvironment messages converge on AXL signaling to selectively protect AML-initiating cells from FLT3-TKI-treatment *in situ*, within the bone marrow niche.

The role of cytokines in AML cell survival has long been questioned, with conflicting results. Thrombopoietin receptor expression has been observed in ~50% of AML patients,⁴² and primary human AML engrafted with higher efficacy in mice where human versions of M-CSF, IL-3, GM-CSF and TPO genes were knocked into murine loci, suggesting a central role for these cytokines in AML engraftment.⁵² The IL-3 receptor was proposed as a marker for AML-initiating cells,⁵³ whose expression led to bad prognosis,⁵⁴ and related to FLT3-ITD mutation.^{40,55} Our data extend these reports and demonstrate that these cytokine receptors are active in FLT3-ITD AML cells, mediating stromal protection against FLT3-TKI treatment by up-regulating AXL expression and activity.

AXL was initially identified as a new TK receptor selectively expressed in normal HSPC and monocytes.⁵⁶ Although its expression fluctuates according to cell physiology and is often up-regulated in solid tumors, only limited knowledge exists with regard to extracellular messages that regulate AXL expression. Interferon alpha, however, was reported to enhance AXL expression in monocytes through a STAT1-

dependent pathway, but the mechanism was not investigated.^{56,57} Our data reveal that the AXL gene exhibits a conserved SRE within its sixteenth intron, mediating the cytokine-dependent recruitment of RNAPol_{III}. Whether other STAT5-activating factors – among them cytokines or growth factors in non-myeloid cells – similarly enhance AXL expression and contribute to tumorigenesis and resistance awaits further investigation.

Our work has shown that STAT5-activating cytokines not only enhance AXL expression but also trigger AXL activation. Besides from the canonical AXL-ligand GAS6, TK receptors such as EGFR or VEGFR, which activate Src kinases,⁵⁸ and FLT3, which interacts with AXL,³¹ were shown to activate AXL. In addition, prostaglandin E2 also increased AMP levels by inducing AXL activation.⁵⁹ We, and others, have shown that AXL functions as a docking site for non-receptor kinases such as Syk and Lyn,^{25,60} and interestingly, these kinases are activated by the stromal cytokines we have focused on.^{61,62} Whether Syk, Lyn or other Src kinases mediate the cytokine-dependent activation of AXL remains to be studied.

AXL expression and function are known to be modulated by O₂ concentration in various solid tumors.³³⁻³⁵ Our present data extend these observations to AML cells. Low O₂ concentration is a well-agreed BM niche hallmark.⁶³ Hypoxia was suggested to down-regulate FLT3 and FLT3-ITD signaling in AML cells,⁶⁴ thus limiting the FLT3-dependent survival of AML-initiating cells. Under such conditions, the PI3K/AKT pathway was shown to sustain AML cell survival, rescuing FLT3 activity.⁶⁵ AXL is known to activate PI3K/AKT signaling in AML, and our data suggest that AXL could provide a crucial PI3K/AKT activation of FLT3-ITD AML-initiating cells in their hematopoietic niche.

Finally, our data have provided *in vivo* evidence that AXL plays a pivotal role in the selective endogenous resistance of FLT3-ITD AML cells to FLT3-TKI targeted therapy. Our results suggest that the dual inhibition of AXL and FLT3 through dual TK inhibitor gilteritinib could be quite effective in eradicating FLT3-ITD AML-initiating cells in the hematopoietic niche.^{66,67} As AXL expression is not restricted to FLT3-ITD AML cells, our data further proposes AXL as a promising target to erase AML-initiating cells protected by their microenvironment, not only in targeted therapy, but also conventional chemotherapy.

Acknowledgments

We thank Mrs. Bernadette De Buhan and her family for their generous support. We wish to acknowledge the Cytometry and Immunobiology, and Genomic Facilities of Institut Cochin / Inserm U1016 for performing cell sorting and microarray screenings, respectively. We acknowledge the Cytometry Facility, Vectorology Facility and Histology Facility of SFR TransBioMed, Bordeaux University. We acknowledge the Obstetric Unit from Orsay Hospital, and Cell Therapy Center from St-Louis hospital (Paris, France) for providing us with CB samples. P.-Y.D. was a recipient of the SIRIC Brio for research fellowship for one year, then the MD-PhD program from the University Hospital of Bordeaux for two years. C.N., S.M-L. were fellows of the “Association pour la recherche contre le Cancer”, “Ligue Nationale contre le Cancer” and Région Ile de France DIM-Biothérapies. A.G. was funded by the SIRIC Brio (grant INCa-DGOS-Inserm 6046) for his work at the UMS 005 TBM Core histopathology platform. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris-Descartes University, Agence Nationale de Recherche (ANR-2011-RPIB-009-04), Ligue Nationale contre le Cancer (RS13/75-6; EL2014-3), Ligue Régionale contre le Cancer (Comité Pyrénées Atlantique) and Cancéropôle Grand Sud-Ouest (2015-0389). The funders had no role in study design, data collection or analysis, the decision to publish or the preparation of the manuscript. We thank D. Bouscary and E. Lauret for their critical reading of the manuscript.

Authorship Contributions

Designed research and analyzed data, P.-Y.D., C.N., I.D.-F. and J.-M.P.; Performed experiments, P.-Y.D., C.N., V.D., S.C., S.M.-L., B.I., A.V., A.A.; Animal experiments, P.-Y.D., J.-M.P., O.M. and B.R.; Original Draft P.-Y.D., J.-M.P. + I.D.F.; Histology A.G and P.D.; Comments on the research direction and edition of the manuscript A.P., V.P., N.M., A.G. and I.V.; Writing – Review & Edition, P.-Y.D., J.-M.P., I.D.F.; Made Figures, P.-Y.D. and C.N.; Funding, P.-Y.D., I.D.-F. and J.-M.P.

Conflict of Interest Disclosure

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(23):2209–2221.
2. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2016;128(5):686–698.
3. Shouval R, Shlush LI, Yehudai-Resheff S, et al. Single cell analysis exposes intratumor heterogeneity and suggests that FLT3-ITD is a late event in leukemogenesis. *Exp. Hematol.* 2014;42(6):457–463.
4. Hirsch P, Zhang Y, Tang R, et al. Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nat. Commun.* 2016;7:12475.
5. Smith CC, Wang Q, Chin C-S, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature.* 2012;485(7397):260–263.
6. Stirewalt DL, Pogossova-Agadjanyan EL, Tsuchiya K, Joaquin J, Meshinchi S. Copy-neutral loss of heterozygosity is prevalent and a late event in the pathogenesis of FLT3/ITD AML. *Blood Cancer J.* 2014;4:e208.
7. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2008;358(18):1909–1918.
8. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood.* 2002;100(1):59–66.
9. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002;100(5):1532–1542.
10. Choudhary C, Brandts C, Schwable J, et al. Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic FIt3-ITD. *Blood.* 2007;110(1):370–374.

11. Schmidt-Arras D, Böhmer S-A, Koch S, et al. Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality. *Blood*. 2009;113(15):3568–3576.
12. Smith BD, Levis M, Beran M, et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103(10):3669–3676.
13. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105(1):54–60.
14. DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, et al. Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood*. 2006;108(12):3674–3681.
15. Cortes JE, Kantarjian H, Foran JM, et al. Phase I study of quizartinib administered daily to patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia irrespective of FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication status. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2013;31(29):3681–3687.
16. Sexauer A, Perl A, Yang X, et al. Terminal myeloid differentiation in vivo is induced by FLT3 inhibition in FLT3/ITD AML. *Blood*. 2012;120(20):4205–4214.
17. Puissant A, Fenouille N, Alexe G, et al. SYK is a critical regulator of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2014;25(2):226–242.
18. Kim K-T, Baird K, Ahn J-Y, et al. Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood*. 2005;105(4):1759–1767.
19. Green AS, Maciel TT, Hospital M-A, et al. Pim kinases modulate resistance to FLT3 tyrosine kinase inhibitors in FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Sci. Adv.* 2015;1(8):e1500221.
20. Sato T, Yang X, Knapper S, et al. FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo. *Blood*. 2011;117(12):3286–3293.
21. Parmar A, Marz S, Rushton S, et al. Stromal niche cells protect early leukemic FLT3-ITD+ progenitor cells against first-generation FLT3 tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.* 2011;71(13):4696–4706.

22. Weisberg E, Liu Q, Nelson E, et al. Using combination therapy to override stromal-mediated chemoresistance in mutant FLT3-positive AML: synergism between FLT3 inhibitors, dasatinib/multi-targeted inhibitors and JAK inhibitors. *Leukemia*. 2012;26(10):2233–2244.
23. Graham DK, DeRyckere D, Davies KD, Earp HS. The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2014;14(12):769–785.
24. Gay CM, Balaji K, Byers LA. Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy. *Br. J. Cancer*. 2017;116(4):415–423.
25. Gioia R, Trégoat C, Dumas P-Y, et al. CBL controls a tyrosine kinase network involving AXL, SYK and LYN in nilotinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *J. Pathol*. 2015;237(1):14–24.
26. Gioia R, Leroy C, Drullion C, et al. Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells. *Blood*. 2011;118(8):2211–2221.
27. Leconet W, Chentouf M, du Manoir S, et al. Therapeutic Activity of Anti-AXL Antibody against Triple-Negative Breast Cancer Patient-Derived Xenografts and Metastasis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 2016;
28. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2013;368(22):2059–2074.
29. Ben-Batalla I, Schultze A, Wroblewski M, et al. Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood*. 2013;122(14):2443–2452.
30. Whitman SP, Kohlschmidt J, Maharry K, et al. GAS6 expression identifies high-risk adult AML patients: potential implications for therapy. *Leukemia*. 2014;28(6):1252–1258.
31. Park I-K, Mishra A, Chandler J, et al. Inhibition of the receptor tyrosine kinase Axl impedes activation of the FLT3 internal tandem duplication in human acute myeloid

leukemia: implications for Axl as a potential therapeutic target. *Blood*. 2013;121(11):2064–2073.

32. Park I-K, Mundy-Bosse B, Whitman SP, et al. Receptor tyrosine kinase Axl is required for resistance of leukemic cells to FLT3-targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(12):2382–2389.

33. Shiozawa Y, Pedersen EA, Patel LR, et al. GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche. *Neoplasia N. Y. N.* 2010;12(2):116–127.

34. Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, et al. Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(37):13373–13378.

35. Mishra A, Wang J, Shiozawa Y, et al. Hypoxia stabilizes GAS6/Axl signaling in metastatic prostate cancer. *Mol. Cancer Res. MCR*. 2012;10(6):703–712.

36. Porteu F, Rouyez MC, Cocault L, et al. Functional regions of the mouse thrombopoietin receptor cytoplasmic domain: evidence for a critical region which is involved in differentiation and can be complemented by erythropoietin. *Mol. Cell. Biol.* 1996;16(5):2473–2482.

37. Casetti L, Martin-Lannerée S, Najjar I, et al. Differential contributions of STAT5A and STAT5B to stress protection and tyrosine kinase inhibitor resistance of chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells. *Cancer Res*. 2013;73(7):2052–2058.

38. Rouyez M-C, Lestingi M, Charon M, et al. IFN regulatory factor-2 cooperates with STAT1 to regulate transporter associated with antigen processing-1 promoter activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2005;174(7):3948–3958.

39. Li G, Ruan X, Auerbach RK, et al. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell*. 2012;148(1–2):84–98.

40. Angelini DF, Ottone T, Guerrera G, et al. A Leukemia-Associated CD34/CD123/CD25/CD99+ Immunophenotype Identifies FLT3-Mutated Clones in Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2015;21(17):3977–3985.

41. Ehninger A, Kramer M, Röllig C, et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2014;4:e218.
42. Rauch PJ, Ellegast JM, Widmer CC, et al. MPL expression on AML blasts predicts peripheral blood neutropenia and thrombocytopenia. *Blood.* 2016;128(18):2253–2257.
43. Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, et al. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood.* 2009;113(24):6206–6214.
44. Braun M, Qorraj M, Büttner M, et al. CXCL12 promotes glycolytic reprogramming in acute myeloid leukemia cells via the CXCR4/mTOR axis. *Leukemia.* 2016;30(8):1788–1792.
45. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat. Med.* 2006;12(10):1167–1174.
46. Pezeshkian B, Donnelly C, Tamburo K, Geddes T, Madlambayan GJ. Leukemia Mediated Endothelial Cell Activation Modulates Leukemia Cell Susceptibility to Chemotherapy through a Positive Feedback Loop Mechanism. *PloS One.* 2013;8(4):e60823.
47. Fiedler W, Graeven U, Ergün S, et al. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood.* 1997;89(6):1870–1875.
48. Dias S, Hattori K, Zhu Z, et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J. Clin. Invest.* 2000;106(4):511–521.
49. Wakabayashi M, Miwa H, Shikami M, et al. Autocrine pathway of angiopoietins-Tie2 system in AML cells: association with phosphatidylinositol 3 kinase. *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc.* 2004;5(4):353–360.
50. Schliemann C, Bieker R, Padro T, et al. Expression of angiopoietins and their receptor Tie2 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2006;91(9):1203–1211.

51. Traer E, Martinez J, Javidi-Sharifi N, et al. FGF2 from Marrow Microenvironment Promotes Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res.* 2016;76(22):6471–6482.
52. Ellegast JM, Rauch PJ, Kovtonyuk LV, et al. inv(16) and NPM1mut AMLs engraft human cytokine knock-in mice. *Blood.* 2016;128(17):2130–2134.
53. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia.* 2000;14(10):1777–1784.
54. Vergez F, Green AS, Tamburini J, et al. High levels of CD34+CD38low/-CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucemies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) study. *Haematologica.* 2011;96(12):1792–1798.
55. Riccioni R, Diverio D, Riti V, et al. Interleukin (IL)-3/granulocyte macrophage-colony stimulating factor/IL-5 receptor alpha and beta chains are preferentially expressed in acute myeloid leukaemias with mutated FMS-related tyrosine kinase 3 receptor. *Br. J. Haematol.* 2009;144(3):376–387.
56. Neubauer A, Fiebeler A, Graham DK, et al. Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood.* 1994;84(6):1931–1941.
57. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MBA, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell.* 2007;131(6):1124–1136.
58. Ruan G-X, Kazlauskas A. Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *EMBO J.* 2012;31(7):1692–1703.
59. Ganesh K, Das A, Dickerson R, et al. Prostaglandin E₂ induces oncostatin M expression in human chronic wound macrophages through Axl receptor tyrosine kinase pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2012;189(5):2563–2573.
60. Ghosh AK, Secreto C, Boysen J, et al. The novel receptor tyrosine kinase Axl is constitutively active in B-cell chronic lymphocytic leukemia and acts as a docking site of nonreceptor kinases: implications for therapy. *Blood.* 2011;117(6):1928–1937.

61. Sangkhae V, Saur SJ, Kaushansky A, Kaushansky K, Hitchcock IS. Phosphorylated c-Mpl tyrosine 591 regulates thrombopoietin-induced signaling. *Exp. Hematol.* 2014;42(6):477–486.e4.
62. Lannutti BJ, Drachman JG. Lyn tyrosine kinase regulates thrombopoietin-induced proliferation of hematopoietic cell lines and primary megakaryocytic progenitors. *Blood.* 2004;103(10):3736–3743.
63. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature.* 2014;508(7495):269–273.
64. Sironi S, Wagner M, Kuett A, et al. Microenvironmental hypoxia regulates FLT3 expression and biology in AML. *Sci. Rep.* 2015;5:17550.
65. Jin L, Tabe Y, Lu H, et al. Mechanisms of apoptosis induction by simultaneous inhibition of PI3K and FLT3-ITD in AML cells in the hypoxic bone marrow microenvironment. *Cancer Lett.* 2013;329(1):45–58.
66. Lee LY, Hernandez D, Rajkhowa T, et al. Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood.* 2017;129(2):257–260.
67. Perl AE, Altman JK, Cortes J, et al. Selective inhibition of FLT3 by gilteritinib in relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a multicentre, first-in-human, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol.* 2017.

Figure 1

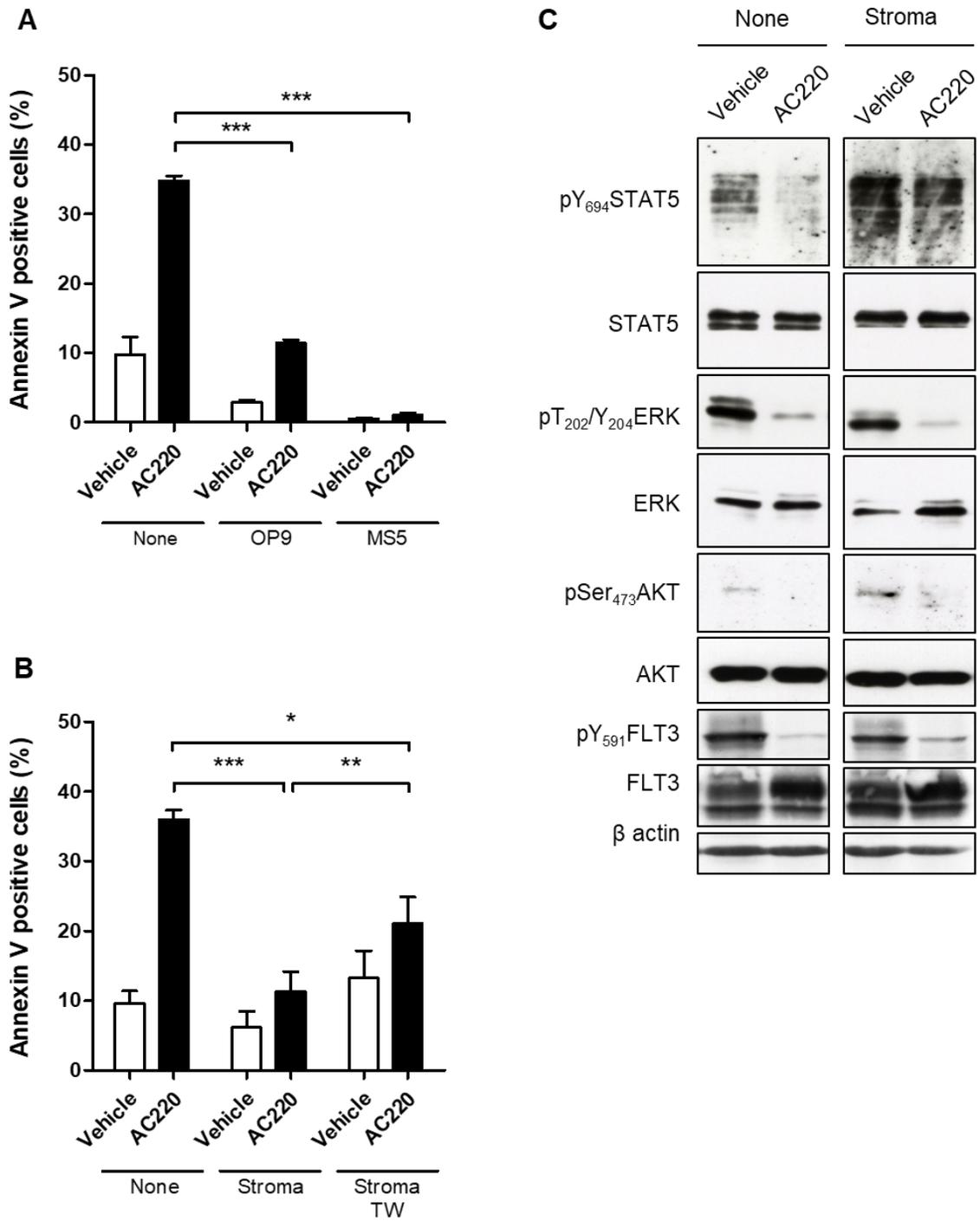


Figure 1. Stroma protection of FLT3-ITD AML cells against FLT3-TKI correlates with enhanced STAT5 activation

(A) MV4-11 FLT3-ITD AML cells were incubated in the absence (Vehicle) or presence of AC220 (3 nM) for 48 hrs, and without (None) or with the indicated stromal cell lines (OP9 or MS5). Cell apoptosis was determined by Annexin V/DAPI labeling followed by flow cytometry analysis. (B) FLT3-ITD AML cell line MV4-11 was incubated in the absence (Vehicle) or presence of AC220 (3 nM) for 48 hrs and without (None) or with OP9 cells separated (TW) or not by transwells. Apoptosis induction was determined as in A. (C) MV4-11 cells were incubated in the absence (Vehicle) or presence of AC220 (1 nM), without (none) or with stromal cells (OP9) for 48 hrs. Immunoblot analysis of the indicated protein β actin serves as a loading control. Graphs show the mean \pm SEM of results of at least three independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, non-significant.

Figure 2

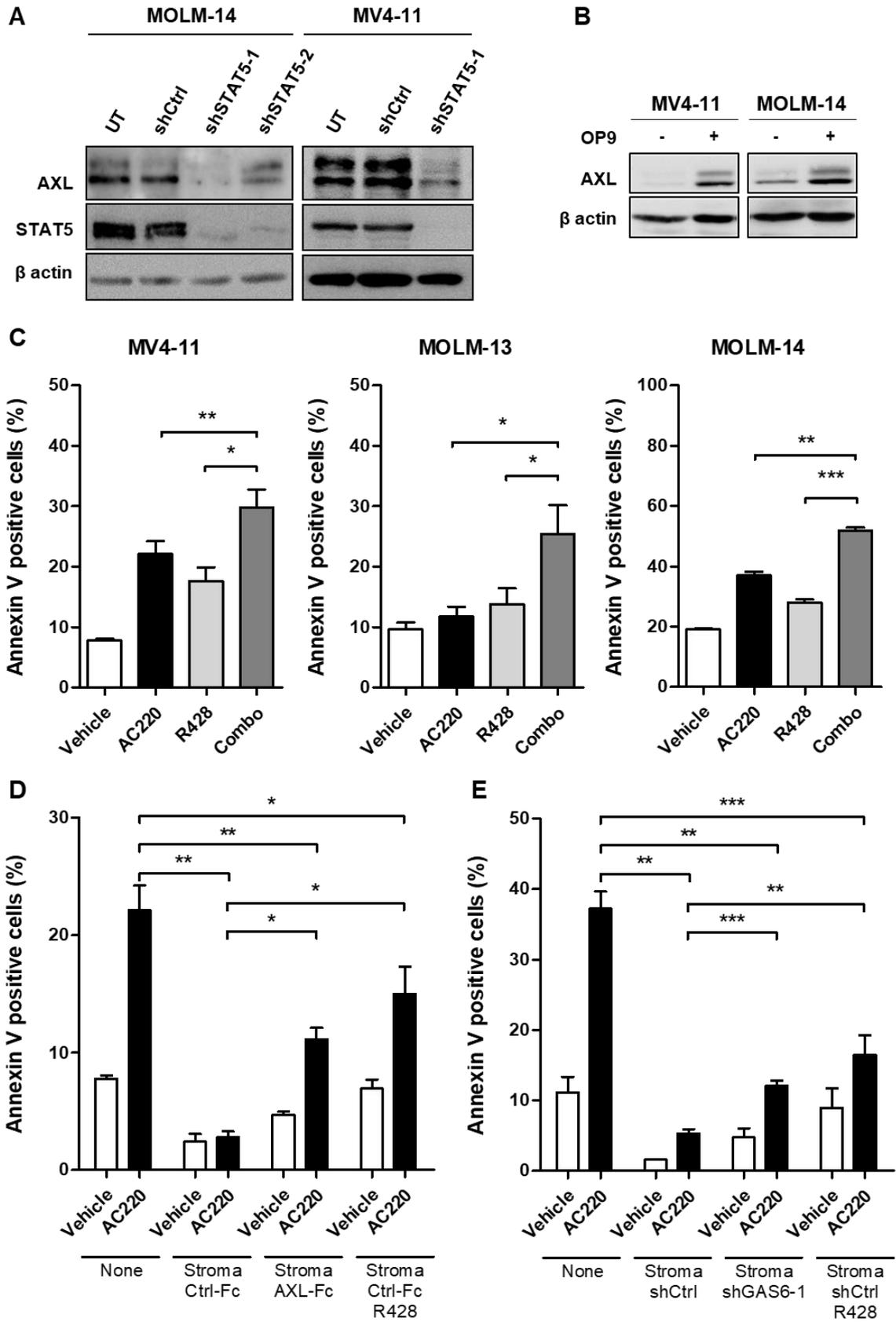


Figure 2. STAT5 up-regulates AXL which contributes to FLT3-ITD AML cell survival

(A) MOLM-14 and MV4-11 cells were transduced with the indicated shRNA encoding lentiviral vectors and lysed 3 days later. Immunoblot analysis of the indicated proteins was performed with β actin as a loading control. (B) MOLM-14 and MV4-11 cells were co-cultured in the absence (-) or presence (+) of OP9 stromal cells for 48 hrs, before being isolated and lysed. The indicated proteins were analyzed by immunoblotting. (C) MV4-11, MOLM-13 and MOLM-14 cells were treated in the absence (Vehicle) or presence of minimal effective (MV4-11, MOLM-14) or suboptimal (MOLM-13) dose of AC220 (1 nM) and R428 (0.3 μ M) or both (Combo) for 48 hrs. Apoptosis induction was determined as in Fig.1. (D) MV4-11 cells were incubated with AC220 (1 nM), without (none) or with stromal cells (OP9) added with Ctrl-Fc (1 μ g/ml) or AXL-Fc (1 μ g/ml) or R428 (0.3 μ M). Cell apoptosis was determined as indicated in Figure 1. (E) MV4-11 cells were incubated in the absence (Vehicle) or presence of AC220 (3 nM), without (None) or with OP9 stromal cells that express shCtrl or shGAS6 or with R428 (1 μ M). Apoptosis induction was determined as described above. Graphs show the mean \pm SEM of results of at least three independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, non-significant.

Figure 3

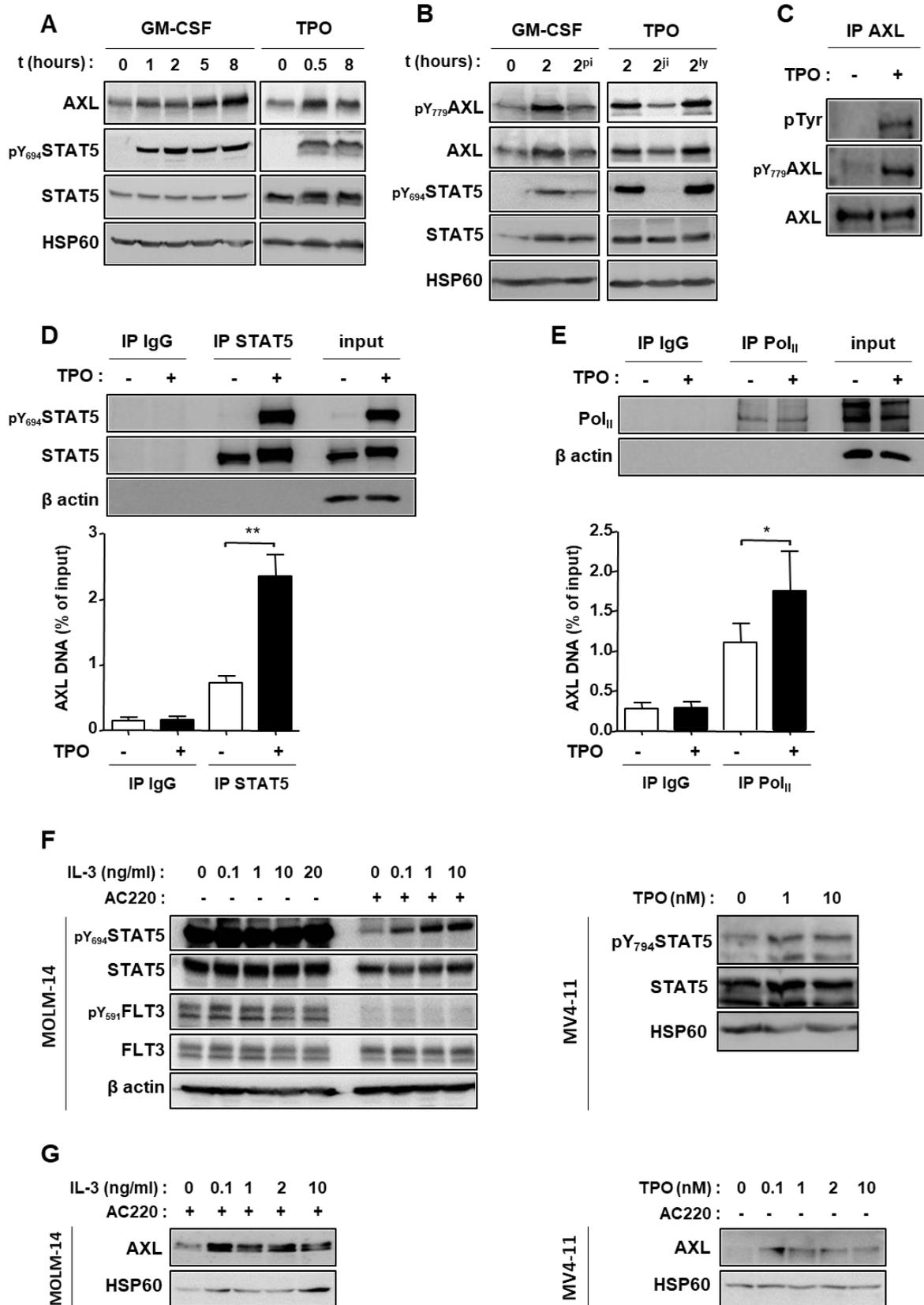


Figure 3. STAT5-activating stroma cytokines up-regulate AXL gene expression and activation

(A) UT7-mpl AML cells were treated with GM-CSF (2.5 ng/ml) or TPO (20 nM) for the indicated time and lysed. Immunoblot analysis of the indicated proteins; HSP60 was used as a loading control. (B) UT7-mpl cells were treated with GM-CSF (2.5 ng/ml) or TPO (20 nM) for the indicated time in the absence or presence of pimozide (pi, 2 μ M), JAK inhibitor (ji, 1 μ M) or Ly294002 (ly, 20 μ M). Total cell lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. HSP60 was used as a loading control. (C) UT7-mpl cells were incubated with (+) or without (-) TPO (20 nM) for 1 hour before being lysed. AXL immunoprecipitates were prepared and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (D-E) UT7-mpl cells were incubated with (+) or without (-) TPO (20 nM) for 30 min. Chromatin-immunoprecipitation (IP) assays were performed using control immunoglobulins (IP IgG), STAT5 (IP STAT5) or RNA polymerase II (IP Pol_{II}) antibodies. Immunoprecipitated proteins (upper panel) were analyzed by western blotting using the indicated antibodies. Immunoprecipitated DNA (lower panel) were analyzed by qPCR using primers spanning the conserved STAT5-responsive element of AXL gene sequence and expressed relative to total lysates (input). (F-G) MOLM-14 or MV4-11 cells were pre-incubated with (+) or without (-) AC220 (5 nM) for 3 hrs before adding IL-3 (MOLM-14) or TPO (MV4-11) at the indicated concentration. Cells were incubated for 4 hrs before being lysed. Immunoblot analysis of the indicated proteins; β actin or HSP60 were used as loading controls. Graphs show the mean \pm SEM of results of at least three independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, non-significant.

Figure 4

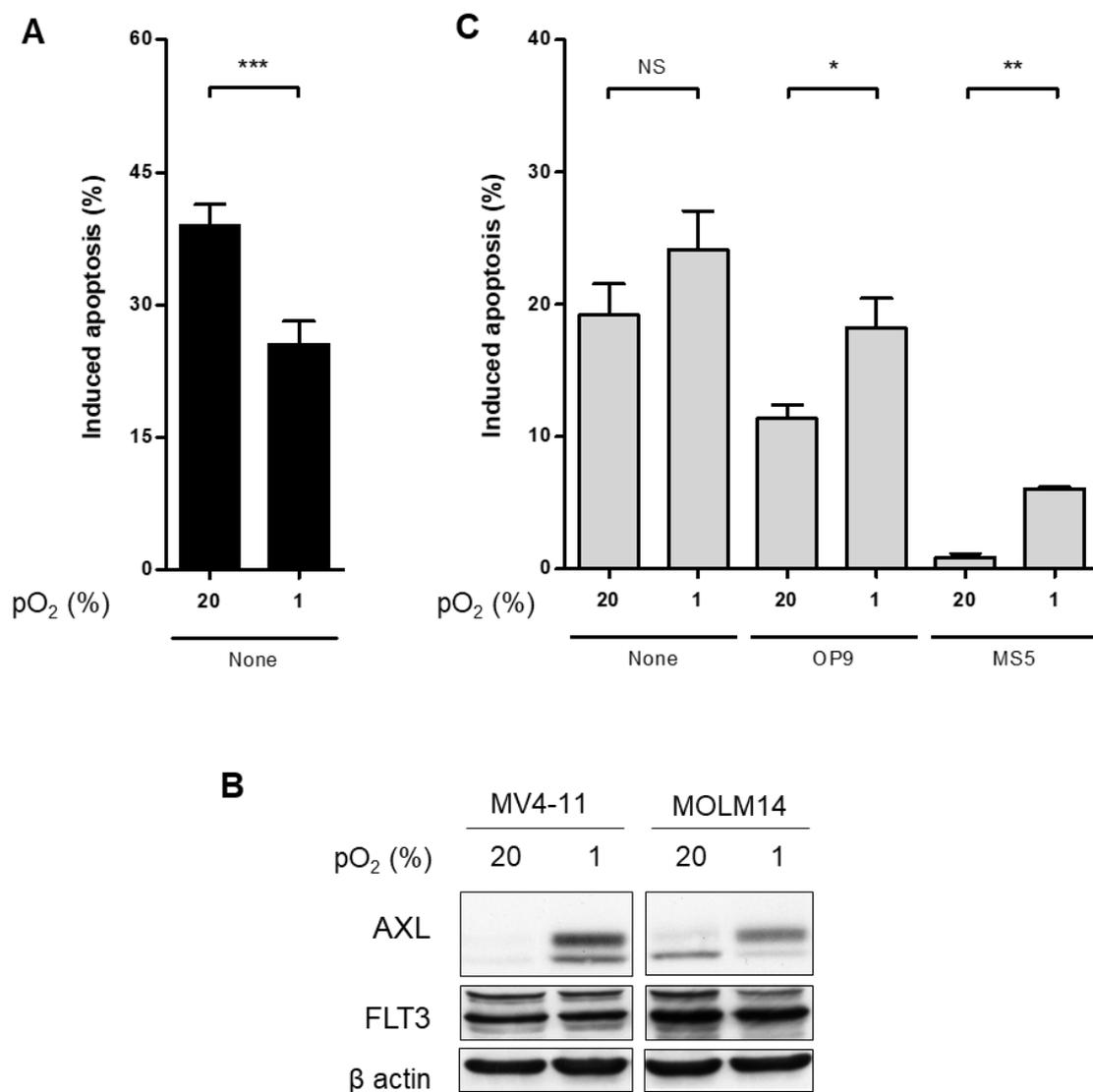


Figure 4. Low O₂ concentration changes stromal protection of FLT3-ITD AML cells against TKI treatments, and up-regulates AXL

(A) MV4-11 cells were incubated in the presence of AC220 (3 nM) for 48 hrs, at 20% or 1% O₂. Apoptosis induction was assessed by Annexin V/DAPI labeling and flow cytometry analysis. (B) MV4-11 and MOLM-14 cells were incubated for 48 hrs at 20% or 1% O₂. Immunoblot analysis of the indicated proteins was performed with β actin as a loading control. (C) MV4-11 cells were incubated in the presence of R428 (1 μ M) for 48 hrs, without (None) or with stromal cells (OP9 or MS5) at 20% or 1% O₂. Apoptosis induction was assessed by Annexin V/DAPI labeling and flow cytometry analysis. Graphs show the mean \pm SEM of results of at least three independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, non-significant.

Figure 5

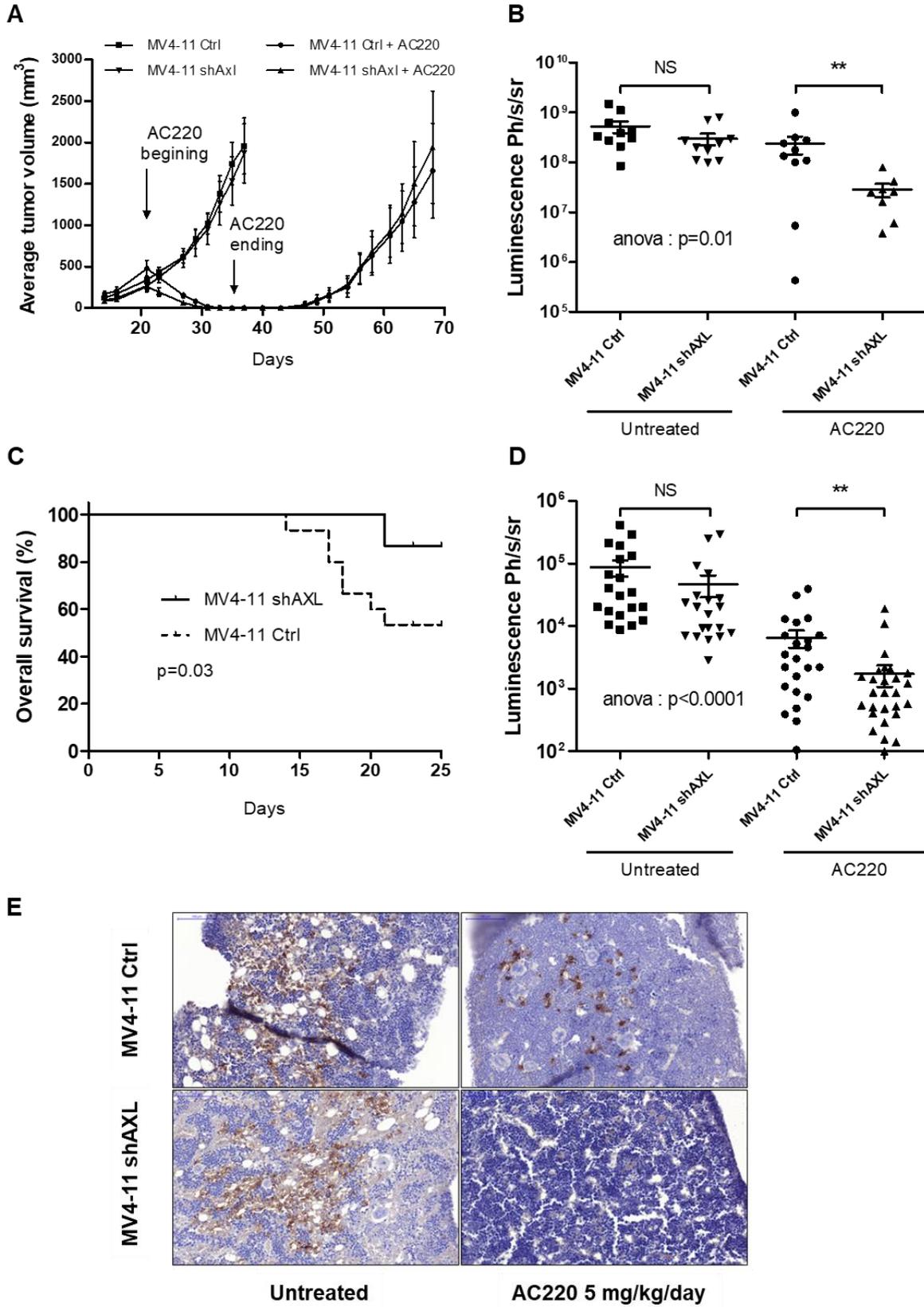


Figure 5. FLT3-ITD AML cell resistance to FLT3-TKI depends on the hematopoietic niche-dependent regulation of AXL activity

(A) Control (MV4-11 Ctrl) or shAXL expressing (MV4-11 shAXL) MV4-11 cells were subcutaneously injected into the limbs of NSG mice at day 0 and treated or not with AC220, as indicated. Tumor volume was measured at the indicated days (mean \pm SEM, n=20). (B) MV4-11 Ctrl-Luc and MV4-11 shAXL-Luc were injected at day 0 (10^6 cells/mouse) in the retro orbital sinus vein of busulfan-pretreated female mice. Mice were then treated or not with AC220 from day 8 to day 14. At day 14, animals were subjected to bioluminescent imaging. (C) Overall survival of untreated mice upon day 0 of engraftment with MV4-11 Ctrl-Luc or MV4-11 shAXL-Luc cells (n=30). Statistical analyses were performed using log rank test. (D) MV4-11 Ctrl-Luc and MV4-11 shAXL-Luc were injected at day 0 (10^6 cells/mice) in the retro orbital sinus vein of busulfan-pretreated female mice. From days 8-14, mice were treated or not with AC220. At day 14, the bioluminescent signal of 96 bones (femurs, tibias), collected from the indicated animals, was quantified *ex vivo* at necropsy. (E) Immunohistochemistry analysis of Human Leucocyte Antigen expression in BM biopsies was collected from the indicated AML cell-injected mice in the absence or presence of AC220. Ph indicates photon, s indicates second and sr indicates steradian. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; NS, non-significant.

SUPPLEMENTAL DATA

SUPPLEMENTAL METHODS

Chromatin immunoprecipitation assay

IP of cell lysates was performed overnight with the indicated antibodies before adding salmon-sperm DNA pre-saturated with protein G-dynabeads (Invitrogen) for 1h at 4°C. Immunoprecipitates were eluted with 1% SDS in 0.1 M NaHCO₃. Formaldehyde cross-linking was reversed by heating for 1 hour at 45°C with proteinase K (40 µg/ml). DNA was extracted and analyzed by real-time quantitative PCR experiments. Two independent pairs of primers that encompassed the conserved STAT-responsive element (SRE) TTCN3GAA of human AXL intron 16 were used (Supplemental Table 2). All PCR assays were performed in triplicate, and the average value obtained for each sample was normalized to the amount of AXL chromatin DNA added to the IP reaction ("input DNA"). 1:10 of beads/immunoprecipitated complexes were removed to conduct an immunoblotting analysis.

AXL, GAS6 and STAT5 gene expression knock-down using shRNA

Viral supernatants were titrated by serial dilutions and a FACS analysis of GFP co-expressed marker in transduced K562 cells 72 hrs later (Accuri C6, Beckton Dickinson). Lentiviruses were added once, at a multiplicity of infection of 5-20 according to the cells. Where necessary, transduced cells were sorted 2-3 days after transduction using GFP. Two different shRNA were used for all targets (Supplemental Table 3). To confirm silencing, AXL, GAS6 or STAT5 protein expressions were analyzed by immunoblotting.

Animal models for *in vivo* studies

For subcutaneous xenografts, female NSG mice received subcutaneous injections into their hind flanks with 1.75×10^6 cells. Tumor growth was measured three times a week. When tumors reached 400-500 mm³, treatments began. At the indicated times, the mice were euthanized by cervical dislocation and tumors weighed. For hematopoietic engraftment, female NSG mice were pretreated with busulfan then engrafted at day 0. At day 7, engraftment was analyzed by whole bioluminescent imaging (BLI) before treating mice with vehicle or AC220 (5 mg/kg/day body weight) by daily oral gavage until the times indicated. At day 14, mice were injected intraperitoneally with firefly luciferase substrate D-luciferin (150 mg/kg) before imaging

using a photon bioimager and M3Vision software (BIOSPACE LAB). Bones, spleen and liver were collected at necropsy and part of these were analyzed by BLI *ex vivo*. Others were fixed in 10% formalin and processed for hematoxylin, eosin and immunohistochemical labeling.

SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1. Antibodies for Western Blot analysis

Primary antibody	Clone	Company
AXL	C44G1	Cell Signaling Technologies
pY ₇₇₉ AXL	713610	R&D
STAT5	sc-835	Santa Cruz Biotech
pY ₆₉₄ STAT5	9351	Cell Signaling Technologies
β actin	AC-15	Sigma
HSP60	SMC-110A	Stressmarq
pY ₅₉₁ FLT3	33G6	Cell Signaling Technologies
FLT3	8F2	Cell Signaling Technologies
pTyr	4G10	Millipore
ERK	L34F12	Cell Signaling Technologies
pT ₂₀₂ /Y ₂₀₄ ERK	D13.14.4E	Cell Signaling Technologies
AKT	9272	Cell Signaling Technologies
pSer ₄₇₃ AKT	D9E	Cell Signaling Technologies
GAS6	A-9	Santa Cruz Biotech
Secondary antibody	Clone	Company
Rabbit IgG-HRP	7074	Cell Signaling Technologies
Mouse IgG-HRP	7076	Cell Signaling Technologies
Goat IgG-HRP	sc-2020	Santa Cruz Biotech
Immunoprecipitation	Clone	Company
AXL	C44G1	Cell Signaling Technologies
RNA polymerase II	N-20, sc-899	Santa Cruz Biotech
STAT5	C-17, sc-835	Santa Cruz Biotech
Rabbit IgG	sc-2027	Santa Cruz Biotech
Goat IgG	0109-01	Southern Biotech

Table S2. Primer sequences for qPCR

	Forward Primer sequences	Reverse Primer sequences
AXL-P1	CCTAGTCTCCCTCAGCTTGG	GCCTCTCCTTCTCACTACCC
AXL-P2	GGGCAGATTCAAGGGGTCTA	TGTTTCCAGCAGAGTTCCCA

Table S3. shRNA sequences

AXL	STAT5	GAS6
AGAACAGCGAGATTTATGACTA	GTA CTACACTCCTGTGTG	GCTGTAATGAAGATCGCGGTA
GGTACCGGCTGGCGTATCA	GCAACAGGCCCATGACCTA	CCTGGCACTGATGGAAATCAA

Table S4. Gene expression change in human CD34⁺ CD38⁻ HSPC upon STAT5 knock-down

Sorted CD34⁺CD38⁻ cells were transduced with STAT5 or control luciferase shRNA and GFP co-encoding lentiviral vectors as previously described.¹ Total RNA was isolated from sorted cord blood (CB) CD34⁺GFP⁺ cells at day 5 post transduction, using Trizol reagent following manufacturer's instructions. Genome wide expression analysis were performed on Affymetrix IVT3' Human Gene U133 plus 2.0 arrays. Two independent transduction experiments with two independent lots of CD34⁺CD38⁻ HSPC were performed and used for microarray screening. Data were analyzed using expression console software and common targets in the two independent experiments were selected for, considering targets with a p value below 0.1. They were ordered according to fold change (FC) of shSTAT5- as compared to shCtrl-expressing cells; only the most down-regulated targets, *i.e.* with FC below -1.7 are shown. Gene Expression Omnibus (GEO) number is GSE97552.

Expr p-value	Expr Fold Change	Gene ID	Symbol	Gene Name
5.53E-02	-1.707	558	AXL	AXL receptor tyrosine kinase
3.95E-02	-1.713	7164	TPD52L1	tumor protein D52-like 1
1.71E-02	-1.730	116832	RPL39L	ribosomal protein L39 like
8.85E-02	-1.753	10978	CLP1	cleavage and polyadenylation factor I subunit 1
7.76E-02	-1.788	6489	ST8SIA1	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1
8.52E-04	-1.794	10457	GPNMB	glycoprotein nmb
3.55E-02	-1.801	346653	FAM71F2	family with sequence similarity 71 member F2
1.88E-02	-1.813	10186	LHFP	lipoma HMGIC fusion partner
3.59E-02	-1.833	157574	FBXO16	F-box protein 16
7.51E-02	-1.838	27240	SIT1	signaling threshold regulating transmembrane adaptor 1
7.18E-03	-1.840	51506	UFC1	ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1
6.42E-03	-1.860	7180	CRISP2	cysteine rich secretory protein 2
8.61E-02	-1.889	1776	DNASE1L3	deoxyribonuclease 1 like 3
1.97E-03	-1.907	332	BIRC5	baculoviral IAP repeat containing 5
2.90E-02	-1.928	4852	NPY	neuropeptide Y
4.76E-02	-1.929	285362	SUMF1	sulfatase modifying factor 1
5.51E-03	-1.935	55041	PLEKHB2	pleckstrin homology domain containing B2
4.40E-02	-1.946	64860	ARMCX5	armadillo repeat containing, X-linked 5
5.27E-02	-1.950	3198	HOXA1	homeobox A1
2.23E-02	-2.073	84144	SYDE2	synapse defective Rho GTPase homolog 2
3.91E-02	-2.079	5450	POU2AF1	POU class 2 associating factor 1
2.29E-02	-2.089	170482	CLEC4C	C-type lectin domain family 4 member C
1.36E-02	-2.246	4692	NDN	necdin, MAGE family member
3.39E-03	-2.509	6776	STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A

SUPPLEMENTAL FIGURES

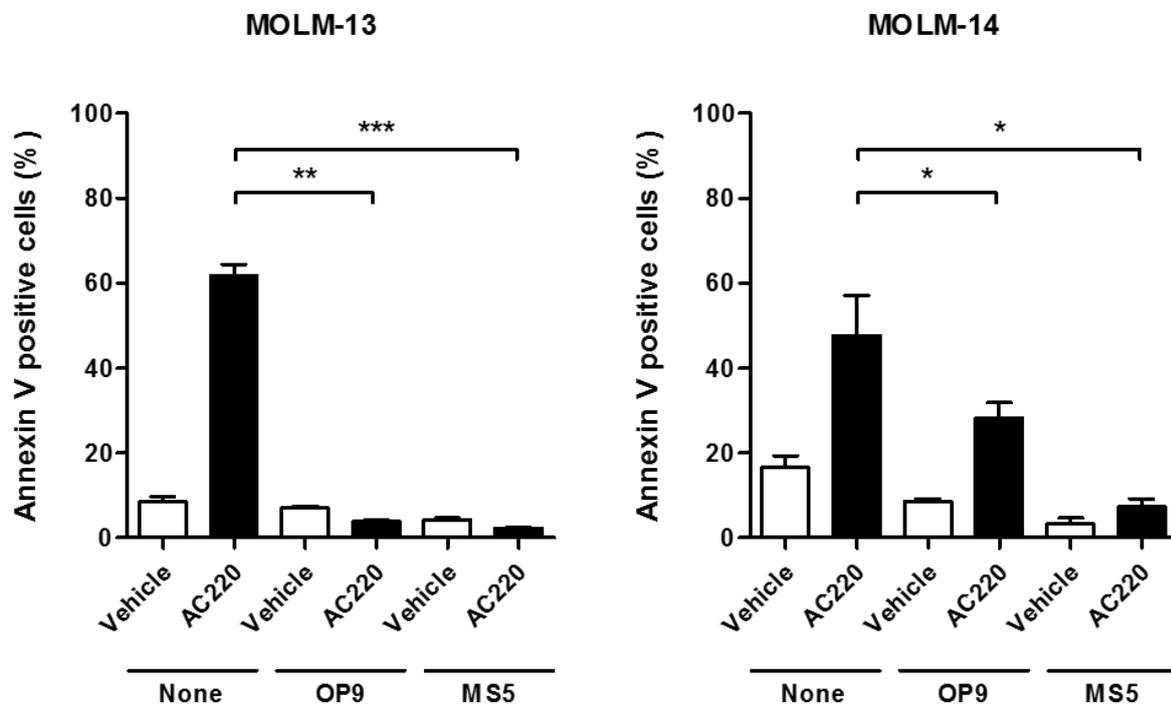
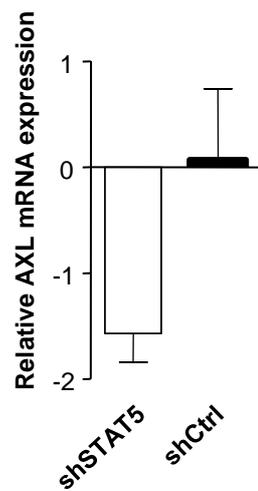
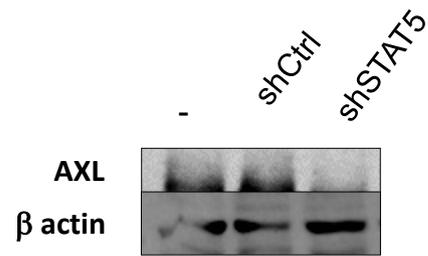


Figure S1. Stromal cells protect FLT3-ITD AML cells from apoptosis upon TKI treatment

MOLM-13 or MOLM-14 FLT3-ITD AML cells were cultured for 48 hours in the absence (Vehicle) or presence of AC220 (3 nM) and in the absence (None) or presence of stromal cell lines (OP9 or MS5), as indicated. Apoptosis was assessed by Annexin V/DAPI labeling and flow cytometry analysis. Data are expressed as mean \pm SEM, $n \geq 3$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, non-significant.

A**B****Figure S2. STAT5 up-regulates AXL expression in human HSPCs**

CD34⁺ CB cells were transduced without (-) or with control luciferase (shCtrl) or STAT5 (shSTAT5) shRNA encoding lentiviral vectors, and were collected 5 days later. (A) RT-qPCR analysis of AXL mRNA in the indicated cells. Results are normalized to GAPDH expression, and expressed relative to untransduced cells (n=3). (B) Immunoblot analysis of the indicated proteins in the indicated cells. β actin is used as a loading control.

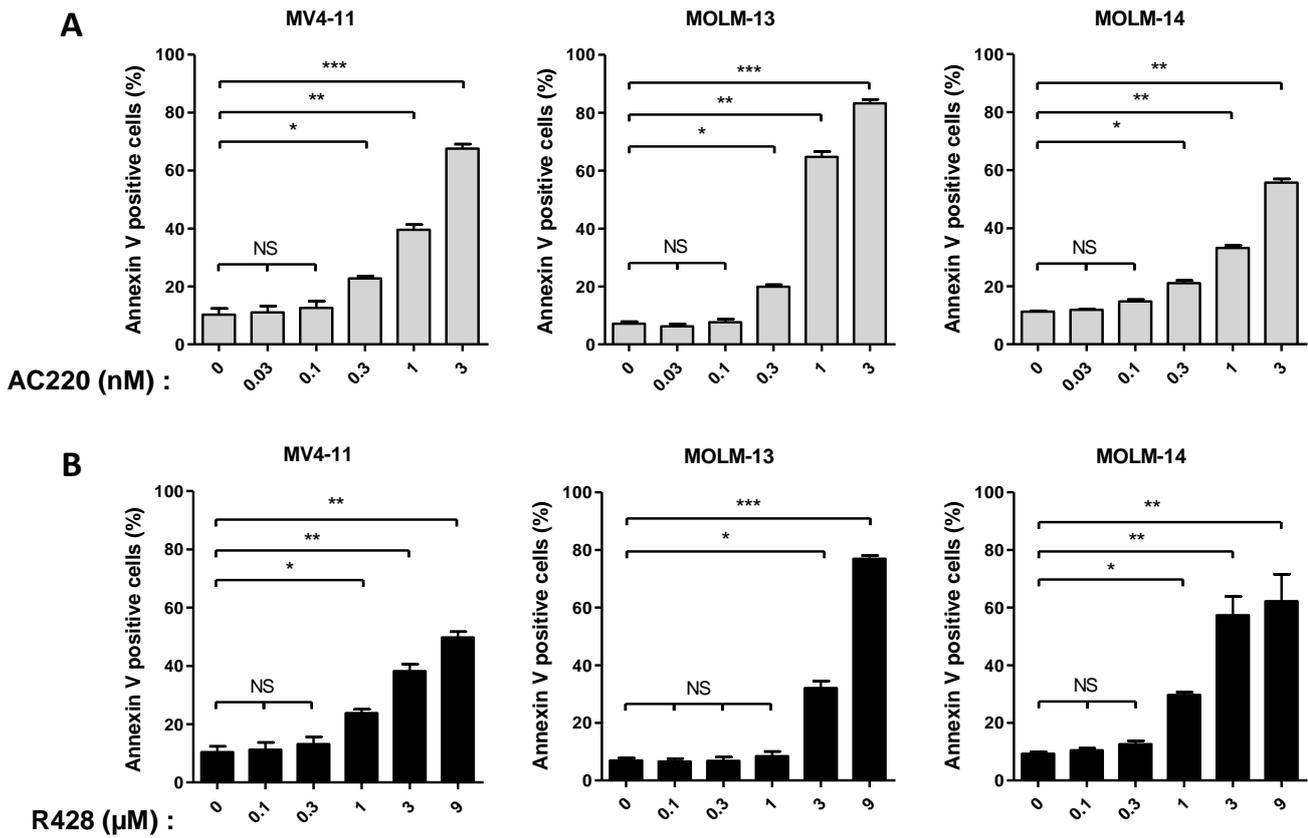


Figure S3. AXL activity contributes to FLT3-ITD AML cell survival

FLT3-ITD AML cell lines MV4-11, MOLM-13 and MOLM-14 were treated in the absence or presence of (A) AC220 or (B) R428 at increasing doses for 48 hours. Apoptosis was then assessed by Annexin V/DAPI labeling and flow cytometry analysis. Data are expressed as mean \pm SEM, $n \geq 3$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, non-significant.

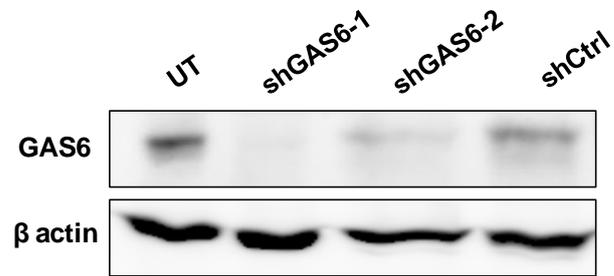


Figure S4. Transduction of stromal cells with GAS6 shRNA-encoding lentiviral vectors inhibits GAS6 expression

Human stromal OP9 cells were either untreated (UT) or transduced with GAS6 (shGAS6-1, shGAS6-2) or scramble (shCtrl) shRNA encoding lentiviral vector and collected 14 days later. Protein expression was assessed by immunoblot analysis. β actin serves as a loading control.

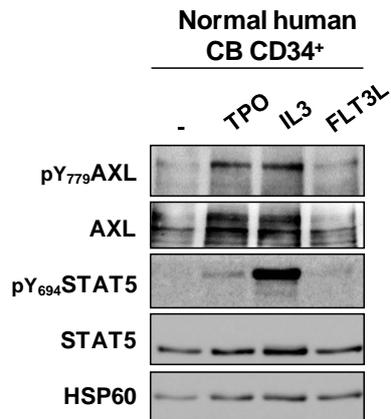
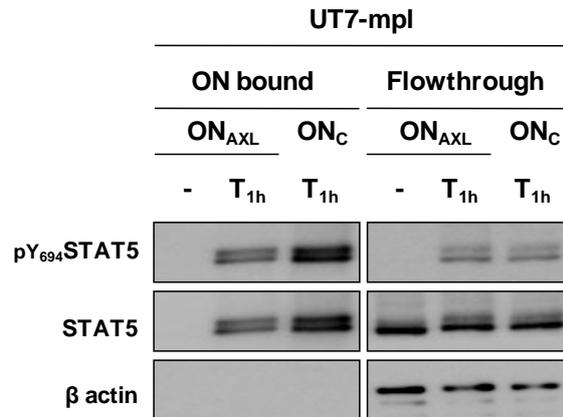
A**B**

Figure S5. STAT5-activating cytokines enhance AXL expression and STAT5 binding to AXL gene sequence

(A) Human cord blood (CB) CD34⁺ cells were incubated in absence of the four-exogenous cytokines/growth factors cocktail for 18 hr before being incubated for 8 hr in the absence (-) or presence of TPO (20 nM), IL-3 (50 ng/ml) or FLT3 ligand (FLT3L, 100 ng/ml) and lysed. Immunoblot analysis of the indicated proteins; HSP60 serves as a loading control. (B) UT7-mpl cells were growth-factor deprived for 18 hr before being incubated in the absence (-) or presence of TPO (20 nM) for 1 hr (T_{1h}). Cells were lysed and oligonucleotide (ON) pulldown assays were performed with biotinylated-AXL (ON_{AXL}) or -consensus (ON_C) SRE from IRF1 promoter sequence. ON-bound and -unbound (flowthrough) proteins were analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. β actin is used as a loading control.

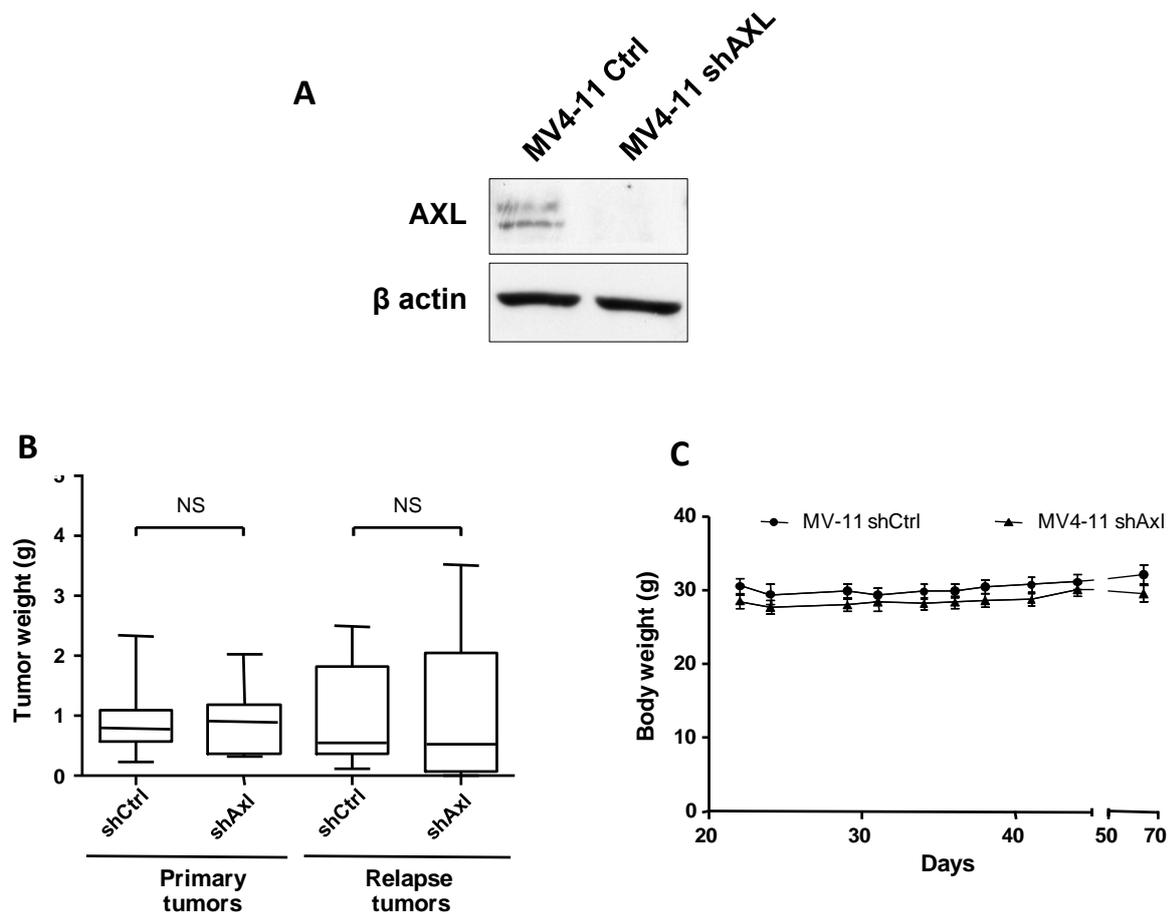


Figure S6. Loss of AXL does not impair leukemia cell growth upon subcutaneous injection

(A) MV4-11 AML cells were transduced with shCtrl or shAXL encoding lentiviral vector. Cells were maintained in culture for 7 days before being sorted for GFP expression and lysed. Proteins were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. β actin serves as a loading control. (B) Weights of collected tumors from NSG mice injected subcutaneously with the indicated shRNA transduced MV4-11 cells. Upon leukemia cell injection, tumors grew and when tumor volume were about 400-500 mm³, half of mice were treated with AC220 (5mg/kg/day) until total tumor regression. Secondary tumors (relapse tumors) reappeared upon AC220 discontinuation. For primary tumors, animals were maintained until ~2 cm³ tumor volume before necropsy (n=10). Secondary (relapse) tumors were collected at day 35 post AC220 treatment stop (n=10). (C) Body weight was measured at the indicated time post injection of MV4-11 shCtrl (circle) or MV4-11 shAXL (triangle) cells. AC220 (5 mg/kg/day) treatment started at day 21 until day 35. Data reported are the mean \pm SEM (n=40); *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; NS, non-significant.

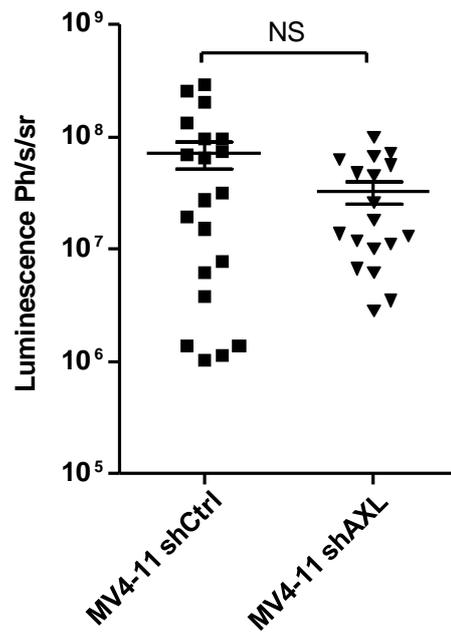


Figure S7. Engraftment of MV4-11 shCtrl and MV4-11 shAXL cells in mice

Quantification of photon flux bioluminescent signals from the whole body of the indicated mice (n=40) at day 7 post sub-cutaneous injection of luciferase-labelled MV4-11 shCtrl or MV4-11 shAXL cells. Ph stands for photon, s for second and sr for steradian. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, non-significant.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Casetti L, Martin-Lannerée S, Najjar I, et al. Differential contributions of STAT5A and STAT5B to stress protection and tyrosine kinase inhibitor resistance of chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells. *Cancer Res.* 2013;73(7):2052–2058.

Article 2

**Dual inhibitor FLT3/AXL Gilteritinib enhances FLT3 inhibition-efficacy in the
specific context of the hematopoietic niche**

Pierre-Yves Dumas, Olivier Mansier, Benoît Rousseau, Melody Dufossée, Vincent Praloran, Arnaud Villacreces, Amélie Guitart, Noël Milpied, Arnaud Pigneux, Isabelle Vigon, Jean-Max Pasquet, Vanessa Desplat

Manuscrit en préparation

Synthèse de l'article 2

Les mécanismes de régulation d'AXL démontrés précédemment suggèrent que les LIC FLT3-ITD, au sein de leur niche, ont tous les atouts pour exploiter les propriétés pro-oncogéniques de ce RTK. L'inhibition concomitante d'AXL et de FLT3 pourrait donc permettre d'atteindre ces cellules et d'améliorer l'efficacité des FLT3-ITK. Trois stratégies pourraient être imaginées : associer un FLT3-ITK à un AXL-leurre visant à dépléter en GAS6, associer un FLT3-ITK à un anticorps monoclonal anti-AXL et enfin utiliser un double inhibiteur FLT3/AXL.

La firme Astellas Pharma Inc. a développé un double inhibiteur, le gilteritinib, et nous avons obtenu un accord type « Material Transfert Agreement » avec ce laboratoire afin d'explorer l'efficacité de ce FLT3/AXL ITK dans nos modèles.

Nous avons démontré qu'à des doses permettant une apoptose-induite similaire au quizartinib en condition de culture classique (O₂ 21% et absence de stroma), le gilteritinib permettait d'obtenir une apoptose nettement supérieure lorsque les cellules leucémiques étaient cultivées en condition de culture approchant les conditions de la niche hématopoïétique (O₂ 1% et co-culture stromale) (Figure 1). Des résultats comparables ont été obtenus avec la lignée MOLM13.

Ces niveaux d'apoptose ont pu être mis en relation avec les niveaux de phosphorylation d'AXL obtenus avec l'ASP2215 en comparaison à l'AC220, dans les différentes conditions de culture, classique ou stroma+hypoxie (Figure 2 sur les MOLM-14, des résultats similaires sont observés dans les MV4-11). L'ensemble des voies de signalisation seront présentées.

Nous avons démontré dans l'article 1 que le « knock-down » d'AXL dans la lignée MV4-11 permettait d'obtenir une réponse au quizartinib plus importante lorsque les cellules étaient dans leur microenvironnement médullaire. Nous avons donc voulu tester la possibilité que le gilteritinib soit plus efficace qu'un FLT3-ITK spécifique du FLT3 tel que le quizartinib. Au vu des effets « off-target » obtenus avec ces ITK, quels qu'ils soient, nous avons, dans un premier temps, réalisé des greffes hétérotopiques, sous-cutanées, de MV4-11 dans un modèle murin de souris immunodéprimées. Nous avons alors testé trois doses de gilteritinib contre la dose de 5 mg/kg/jour utilisée avec le quizartinib. Nous avons déterminé que la dose pour obtenir une réponse similaire en greffe hétérotopique avec le gilteritinib était de 30 mg/kg/jour (Figure 3A). Nous

avons alors réalisé de nouvelles greffes avec « homing » médullaire et testé ces deux doses d'ITK. Nous avons démontré que le gilteritinib à 30 mg/kg/jour, qui permet une réduction du volume de tumeurs sous-cutanées similaire à 5 mg/kg/jour de quizartinib, était nettement plus efficace dans ce contexte spécifique (Figure 3B).

Ces résultats, superposables à ceux obtenus avec la lignée MV4-11 « shAXL » nous encouragent à penser que le gilteritinib permettra probablement d'atteindre une fraction de cellules leucémiques nichées au sein de son microenvironnement. Cette localisation leur permet de résister au quizartinib grâce à une régulation positive d'AXL microenvironnement-dépendante.

Figure 1. Dual inhibition FLT3/AXL allows higher apoptotsis level in FLT3-ITD AML cells specifically co-culture with stromal cells and hypoxia

(A) MV4-11 and (B) MOLM-14 cells were co-cultured in the absence (No stroma) or presence (MS5) of stromal cells for 24 hrs then treated in normoxia (21%) or hypoxia (1%) in the absence (Vehicle) or presence of AC220 (3 nM) or ASP2215 (100 nM) for 48 hrs. Cell apoptosis was determined by Annexin V/DAPI labeling followed by flow cytometry analysis. Graphs show the mean \pm SEM of results of at least three independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, non-significant.

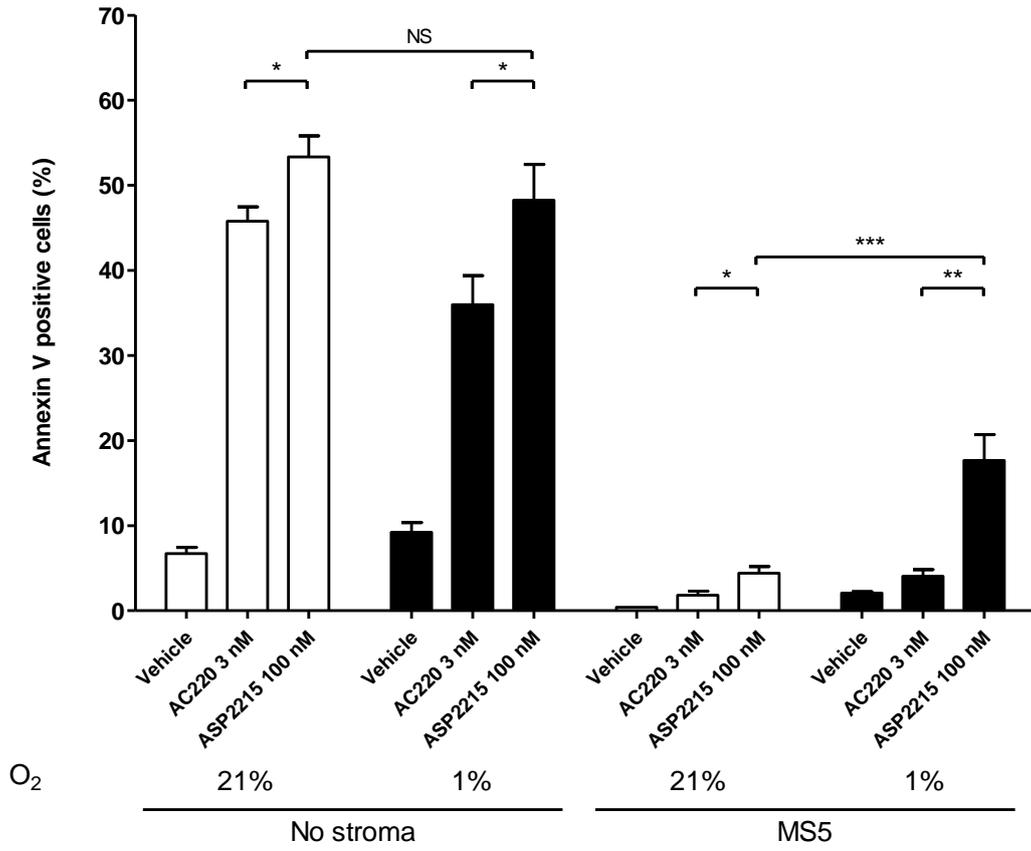
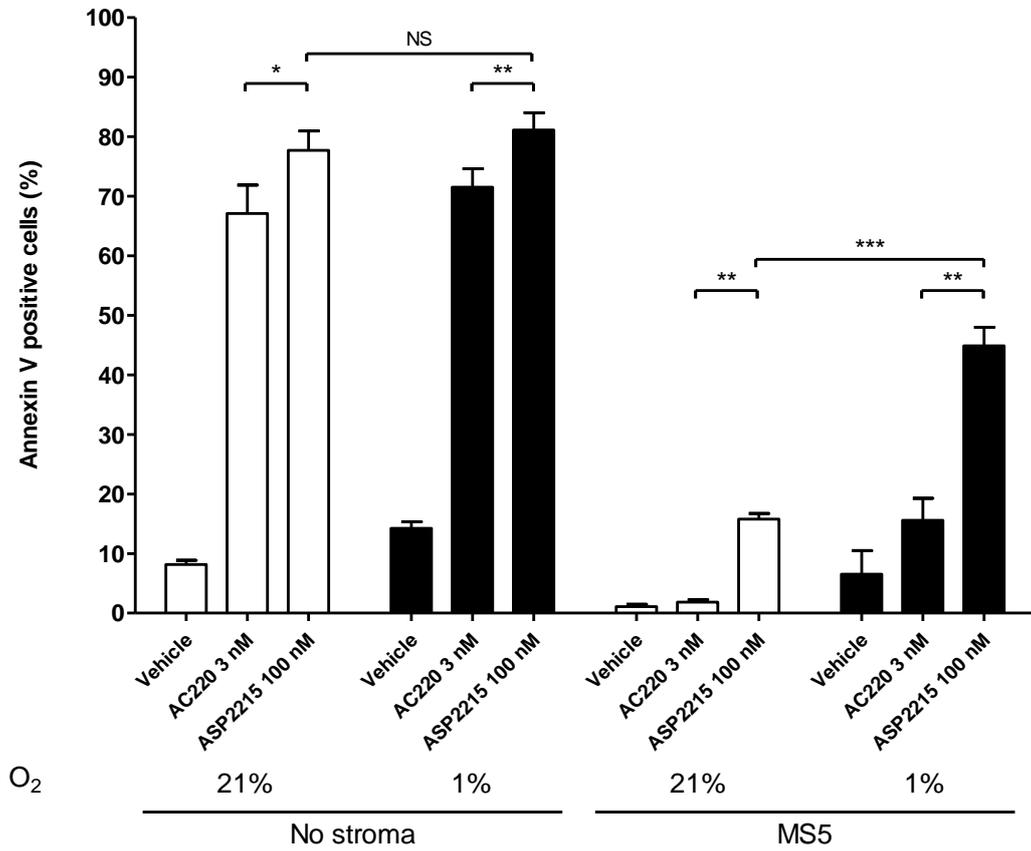
A**MV4-11****B****MOLM-14**

Figure 2. AXL and AKT phosphorylation levels are correlated with FLT3-TKI induced-apoptosis

MOLM14 cells were incubated in the absence (Vehicle) or presence of AC220 (3 nM), ASP2215 (20 nM and 100 nM), in normoxia (21%) or hypoxia (1%) without (no stroma) or with stromal cells (MS5) for 4 hrs. Immunoblot analysis of the indicated protein, β actin serves as a loading control.

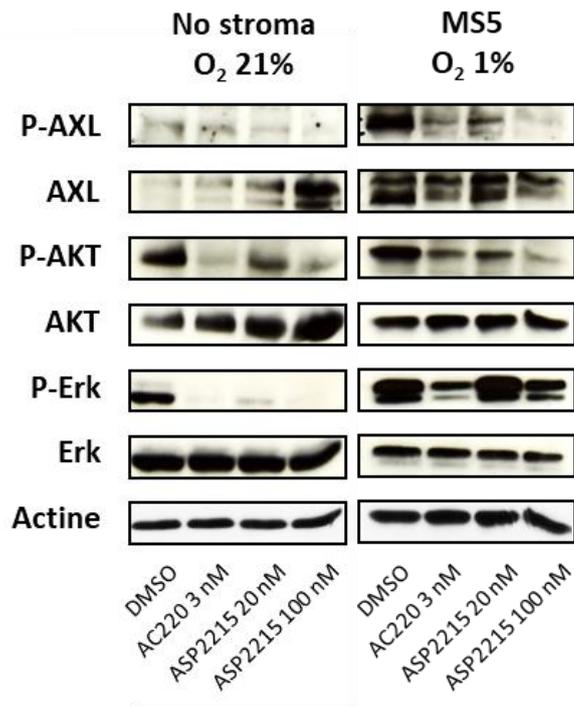
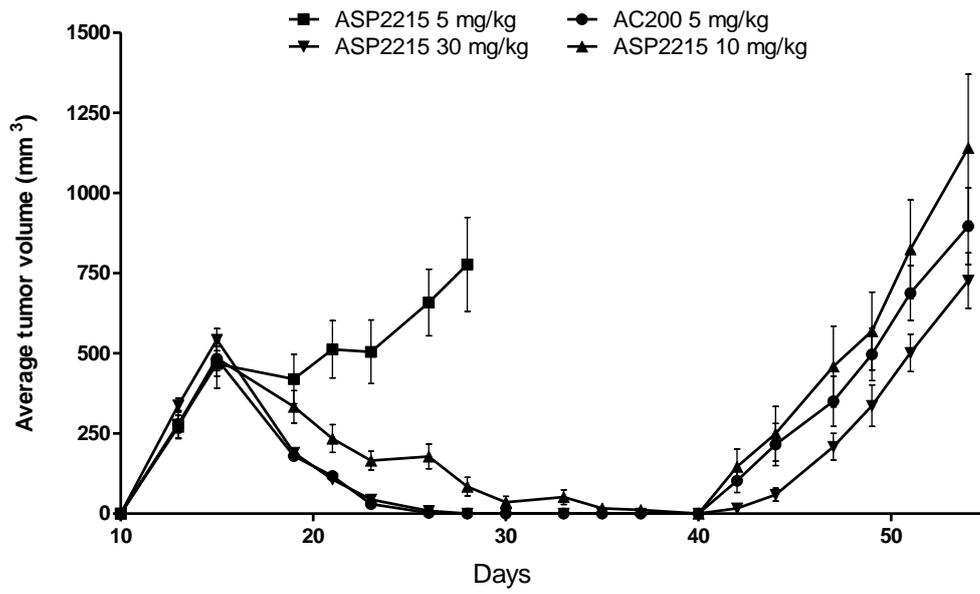
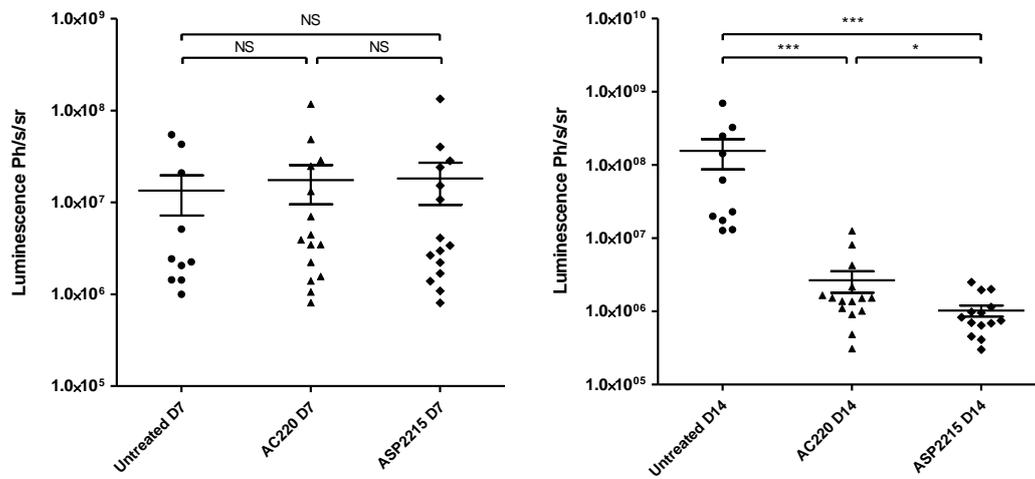


Figure 3. FLT3-ITD AML cell sensitivity to dual FLT3/AXL TKI is particularly unveiled in the hematopoietic niche context

(A) MV4-11 cells were subcutaneously injected into the limbs of NSG mice at day 0 and treated or not with AC220 or ASP2215, as indicated. Tumor volume was measured at the indicated days (mean \pm SEM, n=40 tumors). (B) MV4-11-Luc were injected at day 0 (10^6 cells/mouse) in the retro orbital sinus vein of busulfan-pretreated female mice. At day 7, animals were subjected to bioluminescent imaging to verify engraftment (left panel). Mice were then treated or not with AC220 (5 mg/kg) or ASP2215 (30 mg/kg) from day 8 to day 14, and response has been evaluated at day 14 after one week of treatment (right panel) (n=45 mice). Ph indicates photon, s indicates second and sr indicates steradian. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; NS, non-significant.

A**B**

Article 3

Therapeutic activity of anti-AXL antibody in AML

Pierre-Yves Dumas,* Claire Calmettes,* Vincent Praloran, Arnaud Villacreces, Amélie Guitart, Noël Milpied, Arnaud Pigneux, Vanessa Desplat, Bruno Robert, Jean-Max Pasquet, Isabelle Vigon

Manuscrit en préparation (lettre)

Synthèse de l'article 3

Nous avons enfin testé un anticorps monoclonal anti-AXL, développé par le Dr B. Robert (Equipe « Equipe Criblage fonctionnel et ciblage du cancer », Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, France), précédemment validé dans trois modèles précliniques : le cancer du pancréas, le cancer du sein et la LMC.

Nous avons préalablement démontré, sur cellules de LAM primaires, que l'anticorps permettait une internalisation et une dégradation du récepteur, identique à l'effet observé dans les tumeurs solides (Figure A et B). Néanmoins, l'association avec le quizartinib sur des MV4-11 *in vitro* n'a pas permis de reproduire les résultats observés avec le R428. Nous avons alors constaté, en cytométrie en flux et en immuno-histofluorescence, qu'AXL était majoritairement localisé en intra-cellulaire dans la lignée FLT3-ITD MV4-11, alors qu'il était majoritairement à la surface dans la lignée FLT3-WT OCI-AML3 (Figure C).

Nous avons émis l'hypothèse que cette localisation intra-cellulaire était en lien avec la localisation du récepteur FLT3-ITD, dont la rétention dans le réticulum endoplasmique est connue. Néanmoins, nous n'avons pas réussi à démontrer l'interaction FLT3-AXL par co-immunoprécipitation, démonstration réalisée avec succès dans les travaux de Park *et al.*³⁶¹

Nous avons cependant démontré qu'en présence de lignées de cellules stromales ou lors d'une exposition à une chimiothérapie conventionnelle (cytarabine), les cellules MV4-11 présentaient deux fois plus d'AXL à leur surface. L'hypoxie ne modifiait pas la localisation d'AXL (Figure D).

Dans ce contexte nous avons réalisé des expérimentations *in vivo* et avons démontré, dans un modèle de MV4-11 avec prise de greffe hématopoïétique, que l'association d'un anticorps anti-AXL (200 µg x 3/semaine en intra-péritonéal) avec du quizartinib 5 mg/kg/jour permettait un ratio de réponse de 4,8 en moyenne *versus* 2,4 lorsque le quizartinib 5 mg/kg/jour était associé à une solution saline (Figures E).

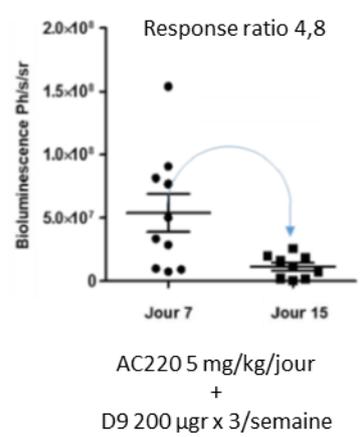
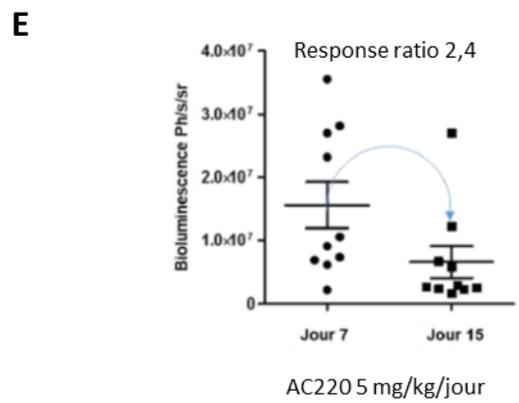
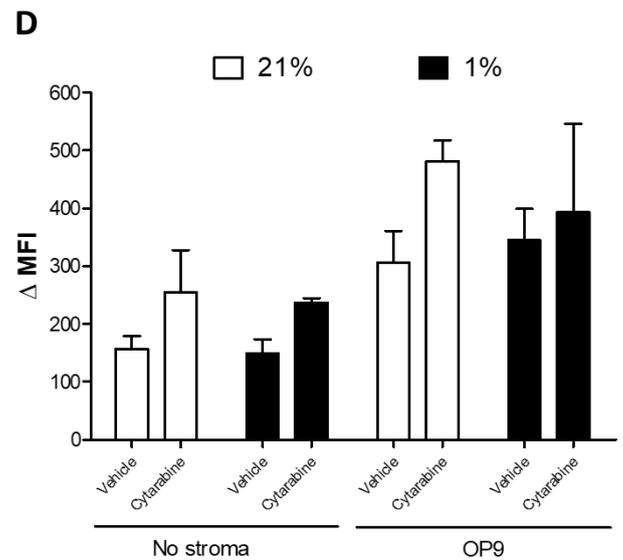
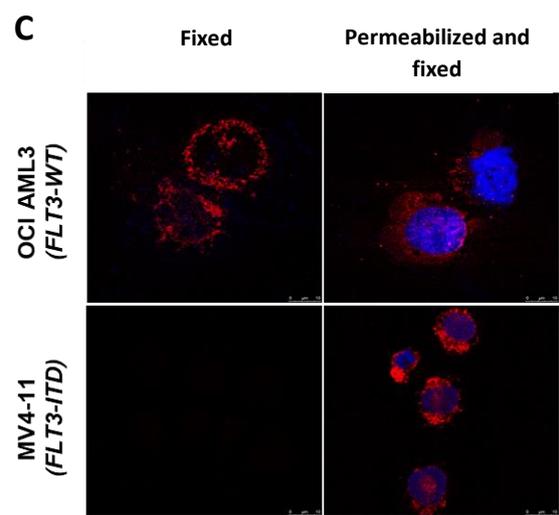
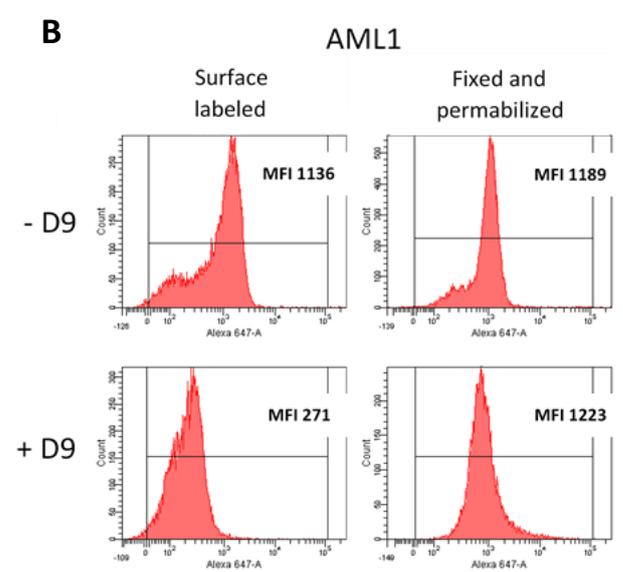
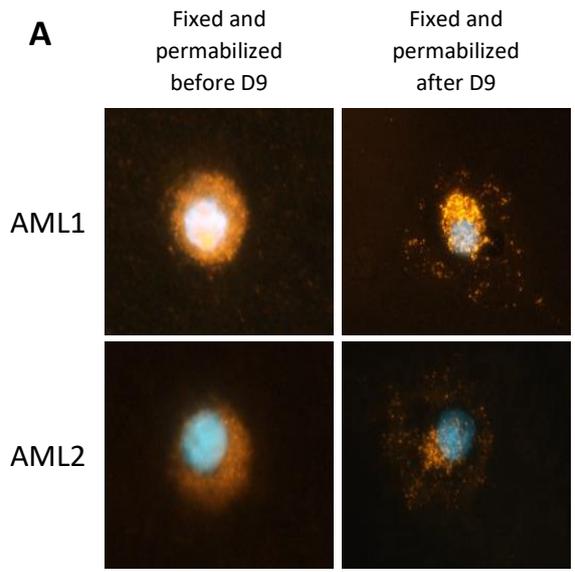
Parallèlement nous avons réalisé des expérimentations *ex vivo* et nos résultats semblent montrer, sur des blastes primaires de patients FLT3-ITD et WT, que l'association d'anticorps anti-AXL et de cytarabine permettrait une meilleure réponse

que l'aracytine seule. Le D9 en monothérapie semble particulièrement efficace dans les LAM FLT3-WT, alors que son effet apparaît intéressant en association avec l'aracytine dans le cadre des LAM FLT3-ITD. Nous pensons que cette constatation est reliée à la modification de la localisation sub cellulaire du récepteur dans les LAM FLT3-ITD qui serait plus présent en surface lorsqu'elles sont exposées à la chimiothérapie comme démontré dans le figure D. Nous avons enfin réalisé une expérimentation *in vivo* associant anticorps anti-AXL et cytarabine mais l'agressivité de la LAM développée a entraîné une mort extrêmement rapide des souris qui ne nous a pas permis de mettre en évidence une éventuelle différence.

Ces résultats montrent que la localisation d'AXL est susceptible d'être modifiée par son microenvironnement et par les chimiothérapies, permettant d'envisager de poursuivre ces travaux afin de mieux définir la pertinence de cette stratégie thérapeutique basée sur un anticorps monoclonal.

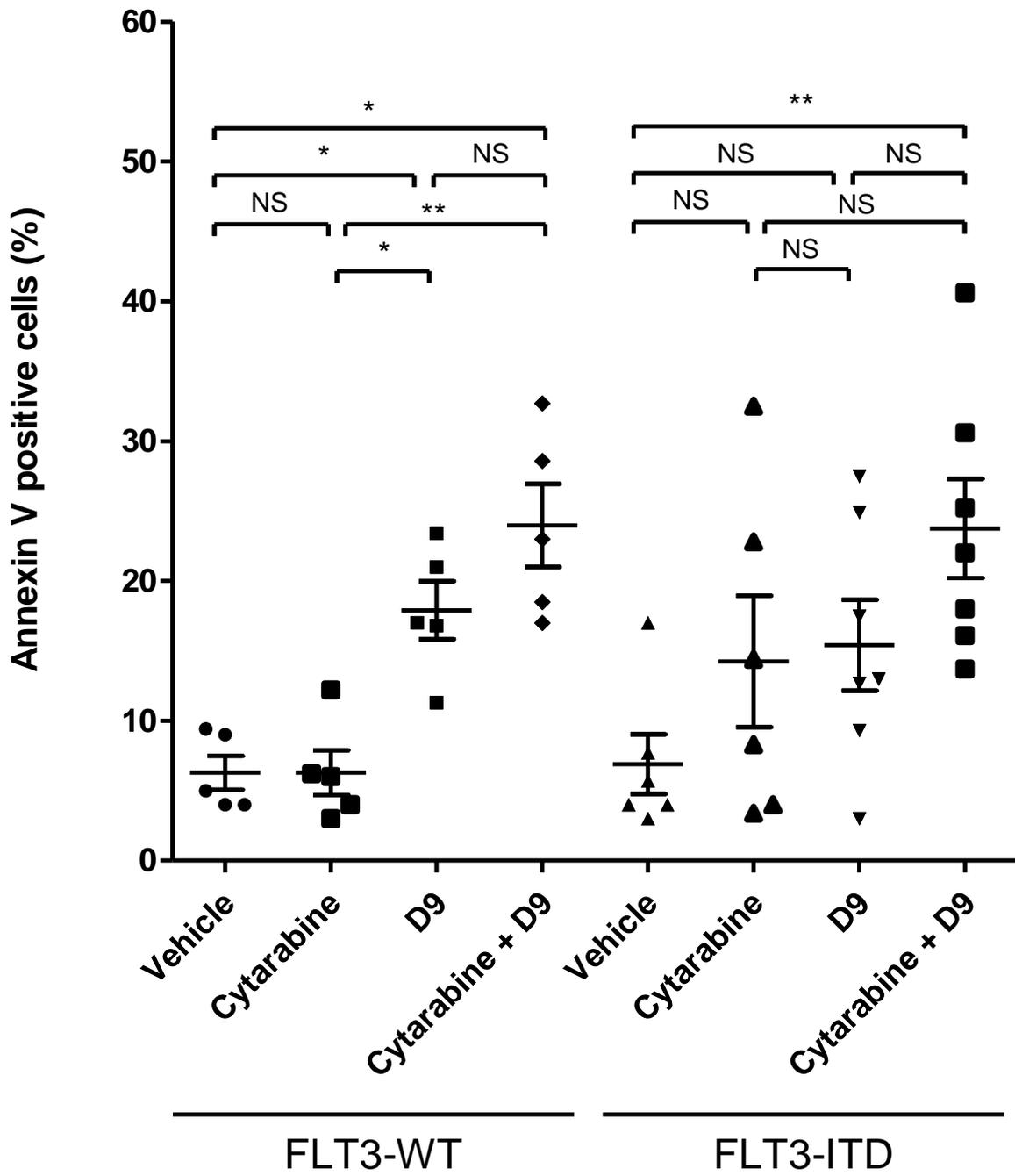
Figure : D9 monoclonal anti-AXL antibody allows AXL internalization and degradation, then a proapoptotic effect in monotherapy and at least an additive effect with cytarabine in primary AML blasts

- (A) Primary AML FLT3-WT AML blasts were fixed and permeabilized before (left panel) or after incubation with D9 (200 µg/ml) for 1hr, then analyzed by anti-AXL immunofluorescence
- (B) Primary AML FLT3-WT AML blasts were surface labeled or fixed and permeabilized, before (top panel) or after incubation with D9 (200 µg/ml) for 1hr, then analyzed by anti-AXL flow cytometry
- (C) MV4-11 (FLT3-WT) and OCI-AML3 (FLT3-ITD) AML cell lines were fixed without (left panel) or after permeabilization (right panel) then analyzed by anti-AXL immunofluorescence
- (D) MV4-11 cells were co-cultured in the absence (no stroma) or presence (OP9) of stromal cells for 24 hrs then treated in normoxia (21%) or hypoxia (1%) in the absence (Vehicle) or presence of Cytarabine (2 µM) for 48 hrs, then analyzed by anti-AXL flow cytometry
- (E) MV4-11-Luc were injected at day 0 (10^6 cells/mouse) in the retro orbital sinus vein of busulfan-pretreated female mice. Mice were then treated with AC220 (5 mg/kg) without (left panel) or with (right panel) D9 monoclonal anti-AXL antibody (200 µg x 3/week) from day 8 to day 14. At day 7, animals were subjected to bioluminescent imaging to verify engraftment, then at day 15 after one week of treatment (n=20 mice). Ph indicates photon, s indicates second and sr indicates steradian
- (F) Primary AML FLT3-WT AML blasts (left panel) and FLT3-ITD AML blasts (right panel) were co-cultured with MS5 stromal cells for 24 hrs before treatment in the absence (Vehicle) or presence of Cytarabine (2 µM), D9 (200 µg/ml) or both for 48 hrs, then analyzed by anti-AXL flow cytometry. Cell apoptosis was determined by Annexin V/DAPI labeling followed by flow cytometry analysis. Graphs show the mean ± SEM of results of at least three independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, non-significant



F

Primary AML blasts



DISCUSSION

Les leucémies aiguës myéloblastiques sont des hémopathies malignes de mauvais pronostic qui nécessitent d'envisager des stratégies thérapeutiques au-delà des associations de chimiothérapies conventionnelles.⁴

Les mutations de type FLT3-ITD sont fréquentes, de mauvais pronostic, tardives dans le processus de leucémogénèse, corrélées aux cytogénétiques de pronostic intermédiaire, aux mutations de *DNMT3A* et de *NPM1*, responsables d'un phénotype fréquemment hyperleucoocytaire, et associées aux sous-types de LAM sans maturation, avec maturation et myélomonocytaires de la classification FAB.⁵³

Sur un plan conformationnel, ces mutations entraînent une perte de la conformation auto-inhibitrice et une dimérisation ligand-indépendante du RTK. Cette activation déclenche les voies PI3K/AKT, anti-apoptotique et MAPK, pro-proliférative. Par ailleurs, la rétention du FLT3 muté au niveau du réticulum endoplasmique entraîne une activation de STAT5, JAK-indépendante, participant aux mécanismes anti-apoptotiques et au blocage de différenciation des cellules leucémiques.¹³²

Sur un plan cellulaire, ces mutations entraînent des perturbations des réactifs dérivés de l'O₂ qui induisent des cassures doubles-brins de l'ADN.¹³⁶ Leur association aux mutations de *DNMT3A* est de pronostic particulièrement sombre, probablement du fait d'un défaut de détection de ces dommages à l'ADN.⁵⁶ Les mutations FLT3-ITD induisent l'expression de récepteurs de la superfamille des TNF et une régulation positive de la sous-unité α du récepteur à l'IL-3.²⁷⁴

Une fraction de cellules FLT3-ITD présente des capacités de « Leukemic Initiating Cell » puisqu'elles sont présentes à la rechute dans 75 à 90% des cas. Cette mutation est considérée comme une cible thérapeutique pertinente : des preuves de l'addiction de la cellule cancéreuse à cet oncogène ont été apportées, relatives à la perte de leur allèle sauvage et au développement de mutations de résistance spécifiques aux ITK.¹⁶⁸ Un point reste en suspens : l'expression protéique du RTK FLT3 muté dans la fraction la plus souche des cellules leucémiques, pour lequel il existe des données contradictoires.

Différents FLT3-ITK ont été utilisés, majoritairement des inhibiteurs multi-kinase issus de repositionnement de médicaments mais l'un d'entre eux, le quizartinib a été spécifiquement créé comme inhibiteur du FLT3. L'ensemble de ces FLT3-ITK se heurte, en monothérapie ou en association, à des mécanismes de résistance variés. Une grande part de ces mécanismes de résistance sont récepteur-indépendants, non seulement chez les patients réfractaires primaires, mais aussi chez ceux qui évoluent sous traitement. Chez ces derniers, la part des mécanismes de résistance indépendants de mutations au sein du TKD2 a longtemps été sous-évaluée. Ils sont pourtant fréquents et assurent le maintien d'une signalisation oncogénique lorsque l'oncogène prépondérant est inhibé, par un FLT3-ITK par exemple.²¹⁹

Les cellules leucémiques les plus souches, responsables des rechutes plusieurs mois ou années après les traitements initiaux sont nichées dans un microenvironnement sanctuaire que nous pouvons simplifier à trois composantes aux fonctions intriquées : cellulaire, cytokinique et hypoxique. Ces caractéristiques, participant physiologiquement au maintien d'une hématopoïèse normale, sont aussi exploitées par les LIC pour maintenir une hématopoïèse leucémique et résister aux traitements.

Dans le cadre de cette résistance des LIC aux chimiothérapies, le rôle du microenvironnement semble particulièrement important lorsque les LAM FLT3-ITD sont exposées aux FLT3-ITK, notamment au quizartinib.²⁰⁷

L'étude du rôle d'AXL dans ce mécanisme spécifique nous a semblé particulièrement pertinent car ce RTK est impliqué dans la résistance aux traitements de nombreux cancers. Ce point est appuyé par une littérature abondante sur le sujet : AXL active des mécanismes de « bypass signaling » indépendamment de toute mutation. La régulation de l'expression d'AXL a été étudiée dans plusieurs modèles mais peu de données existent sur les messages extra-cellulaires susceptibles d'augmenter son expression.

L'expression HIF1 α -dépendante d'AXL est connue dans les cellules endothéliales,³²³ de cancer du rein,³²⁵ et de cancer de prostate,³⁸⁰ et appuyée par la présence de 6 séquences « HIF-responsive Element » dans son promoteur. Par ailleurs, certaines données du laboratoire tendraient à prouver que l'hypoxie

allongerait la demi-vie de la protéine d'AXL, alors que celle du FLT3, WT ou ITD, est connue pour être raccourcie.³¹⁵

En aval, AXL active les voies PI3K/AKT et MAPK, susceptibles d'assurer la signalisation du FLT3-ITD lorsque celui-ci est inhibé ou absent. Enfin, l'activation d'AXL semble maximale lorsque les cellules environnantes présentent des PtdSer à leur surface. L'activité d'AXL est donc décuplée lorsque les cellules environnantes entrent en apoptose. Ce mécanisme est particulièrement intéressant pour les LIC FLT3-ITD qui pourraient devenir d'autant plus résistantes aux FLT3-ITK que les cellules FLT3-ITD périphériques entrent en apoptose induite par l'ITK.

Le premier objectif de mon travail de doctorat testait l'hypothèse que la protection spécifique du microenvironnement contre les effets du quizartinib pouvait être, au moins en partie, due à ce RTK particulier.

Nous avons démontré dans un premier temps que la protection médiée par le stroma était associée à un maintien de la phosphorylation de STAT5, et que ce dernier entraînait une régulation positive de la transcription d'AXL grâce à une séquence « STAT5 responsive Element » SRE située au sein de l'un de ses introns. Par ailleurs, nous avons démontré que les cytokines activatrices de STAT5 induisaient une activation directe du récepteur, indépendante de la présence de son ligand. Dans ce cadre, le rôle de la Src kinase LYN pourrait être évoqué. Son rôle au sein d'un signalosome impliquant les récepteurs à l'IL-3, au GM-CSF,³⁹⁹ et à la TPO,⁴⁰⁰ a déjà été démontré, ainsi qu'au sein d'un signalosome impliquant AXL.²²⁵ Les mécanismes de phosphorylation impliqués sont pour l'instant inconnus.

L'IL-3 est une cytokine jouant un rôle dans la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes et lymphoïdes, particulièrement en association avec le FLT3-ligand, au moins *in vitro*. Son récepteur a été suggéré comme marqueur de LIC,⁶⁷ et son expression par les blastes de LAM est corrélée à un mauvais pronostic.³⁰⁰ Il est particulièrement surexprimé sur les blastes de LAM FLT3-ITD.²⁹⁹ Nos données démontrent que cette cytokine permet de maintenir une activation de STAT5 dans différents modèles de cellules hématopoïétiques normales ou leucémiques. Nous démontrons aussi qu'elle induit une surexpression d'AXL STAT5-dépendante, telle que celle que l'on observe lorsque les cellules de LAM FLT3-ITD sont cultivées sur différents stromas.

Néanmoins, dans nos modèles d'études, *in vitro* ou *in vivo*, l'IL-3 ne peut être directement responsable de l'effet observé puisque l'IL-3 est une cytokine spécifique d'espèce. Si les lignées stromales murines sécrètent de l'IL-3, celle-ci ne peut pas activer le récepteur humain correspondant des cellules de LAM humaines. D'autres données, non présentes dans les articles en cours, nous ont permis de démontrer que l'ajout d'IL-3 humaine à une co-culture de cellules de LAM FLT3-ITD humaines et de cellules stromales murines permet d'augmenter le niveau de protection *versus* le FLT3-ITK, de manière particulièrement soutenue sur stroma et en condition de basse pression en O₂.

D'autres cytokines activatrices de STAT5 peuvent néanmoins être évoquées pour expliquer cet effet, entre autres la TPO. Contrairement à l'IL-3, cette dernière est indispensable au maintien d'une hématopoïèse normale et au maintien des CSH. Elle est sécrétée localement par les CSM et les mégacaryocytes. Elle a par ailleurs été impliquée dans la stabilisation de HIF1 α indépendamment de toute condition hypoxique.²⁶³ Son récepteur MPL est fréquemment exprimé par les blastes de LAM et son rôle pro-prolifératif a été démontré dans certaines LAM.²⁹⁷ D'autres données, non présentes dans les articles en cours, nous ont permis de démontrer que l'ajout de TPO humaine à une co-culture de cellules de LAM FLT3-ITD humaines et de cellules stromales murines ne modifiait pas la sensibilité au FLT3-ITK, probablement par la redondance de l'ajout de cytokine humaine sur la co-culture stromale murine puisque la TPO présente une spécificité croisée.

D'autres cytokines activatrices de STAT5 pourraient encore être évoquées, telles que le G-CSF, le SCF ou le PDGF qui exercent des réactivités croisées humaines et murines. Nos expérimentations, conduites dans un modèle murin, confirment nos données et suggèrent là-aussi l'intervention de cytokines à réactivités croisées. Ces réflexions rejoignent les concepts discutés en introduction, le microenvironnement murin n'est pas le microenvironnement humain, ces modèles d'étude ont forcément leurs limites. Il a d'ailleurs été démontré que le « knock-in » de gènes de cytokines humaines dans les loci correspondants de gènes murins permettait d'améliorer la prise de greffe des cellules de LAM, confirmant l'importance de cette signalisation pour la cellule leucémique.²⁷²

Le rôle de l'hypoxie dans la régulation d'AXL avait déjà été démontré dans d'autres modèles, nous avons confirmé que cet effet s'appliquait aussi aux cellules de

LAM. En hypoxie, les cellules accumulent, classiquement, de hauts niveaux de HIF1 α et déclenchent un programme transcriptionnel spécifique. Les tissus « solides » hypoxiques doivent déclencher des mécanismes d'adaptation impliquant des mécanismes généraux : hyperventilation, augmentation de l'hémoglobine, et locaux : néo-angiogenèse, vasodilatation. Dans le cadre d'un tissu « liquide », tels que le tissu hématopoïétique, la situation est différente. Les cellules « hypoxiques » peuvent modifier leur localisation pour retrouver des niveaux d'O₂ optimaux. De plus ces cellules sont intrinsèquement programmées pour s'adapter aux modifications des pressions en O₂ : les leucocytes naissent d'une CSH qui est nichée dans un environnement à 1% d'O₂, puis ils passent dans les vaisseaux dans lesquels le niveau d'O₂ varie entre 14% dans le système artériel et 5% dans le système veineux. Lorsqu'ils sont requis dans un tissu, leur extravasation les amène dans un environnement dans lequel les niveaux d'O₂ sont à nouveau très bas.

Dans le cas des LAM, il existe des données contradictoires sur le rôle de HIF1 α . Quoiqu'il en soit, en hypoxie, les cellules surexpriment le CXCR4,⁴⁰¹ diminuent l'expression de FLT3,³¹⁵ et sécrètent plus d'IL-8. Cette dernière est une chimiokine pro-inflammatoire qui agit comme facteur chemoattractant sur les CSM. Sa surexpression est plus prononcée dans les blastes de LAM FLT3-ITD que WT et de mauvais pronostic exclusivement dans le premier sous-groupe.⁴⁰² Sur le plan thérapeutique, les blastes en hypoxie rentrent en quiescence, expliquant leur résistance à la cytarabine. D'autres mécanismes sont impliqués, entre autres l'activation de la voie PI3K/AKT, anti-apoptotique. La surexpression d'AXL dans ce modèle n'avait jamais été démontrée et nous avons vu dans l'introduction que les LAM présentant de hauts niveaux de GAS6 ont aussi de hauts niveaux de CXCR4, aucun travail n'a exploré les intrications de ces deux voies dans les conditions du microenvironnement médullaire.

A l'issue de sa régulation positive par les cytokines activatrices de STAT5 et les basses pressions en O₂, AXL doit être activé par son ligand. Cinq ligands putatifs pourraient être impliqués mais seuls deux ont démontré leur capacité à activer ce RTK : GAS6 et TULP1. Le rôle de ce dernier dans les LAM est inconnu, son expression par les cellules leucémiques est faible, ne préjugant néanmoins pas de son niveau d'expression dans la niche hématopoïétique puisqu'il pourrait être sécrété par les CSM ou les cellules endothéliales. La GAL3, ligand prouvé de MERTK, a été impliquée dans

les LAM en tant que facteur pronostique péjoratif,³⁴⁸ néanmoins la pluralité des mécanismes dans lesquels sont impliqués ces molécules ne permet pas d'émettre d'hypothèse solide lui conférant un rôle particulier à travers AXL. Ce point mériterait néanmoins d'être exploré, la lignée stromale OP9 sécrète, par exemple, de très hauts niveaux de GAL3.

Quoiqu'il en soit, la signalisation d'AXL GAS6-dépendante est fortement impliquée dans la résistance des LAM aux chimiothérapies. Ce point avait été démontré grâce aux AXL-leurres dans la sensibilisation des cellules de LAM FLT3-WT et -ITD en monothérapie, ou en association avec de la cytarabine. Nous l'avons démontré en utilisant une dose minimale efficace de quizartinib pour diminuer au maximum le risque que l'effet observé soit « off-target ». Au-delà des AXL-leurres, nous avons utilisé d'autres techniques d'inhibition d'AXL, incluant des stratégies de « knock-down » du ligand dans les cellules stromales et un AXL-ITK, le R428.

Pour notre démonstration *in vivo*, nous avons souhaité utiliser une stratégie d'inactivation génique afin de se prémunir des effets « off-target » des ITK dans un modèle dans lequel on ne peut pas contrôler la concentration à laquelle est exposée la cellule leucémique, particulièrement au sein de la niche hématopoïétique. En associant cette stratégie d'inactivation génétique d'AXL à une dose de quizartinib connue pour inhiber le FLT3 *in vivo*, nous avons pu mettre en évidence un effet pro-apoptotique plus élevé en absence d'AXL qu'en sa présence. Cette démonstration n'avait jamais été faite ni avec une inactivation génétique, ni avec du quizartinib.

Au-delà de ce travail de recherche fondamentale sur l'implication d'AXL dans la résistance des LAM FLT3-ITD au quizartinib, nous avons poursuivi nos travaux avec deux stratégies d'inhibition d'AXL innovantes : le double inhibiteur FLT3/AXL gilteritinib et un anticorps monoclonal anti-AXL.

Le second article de ce doctorat, en cours de rédaction et nécessitant de renouveler certaines expérimentations, a démontré que le gilteritinib permettait une apoptose-induite supérieure au quizartinib dans des conditions de culture *in vitro* reproduisant des caractéristiques, certes caricaturales, du microenvironnement médullaire : CSM, cytokines et hypoxie. Par ailleurs, l'utilisation de doses permettant un effet superposable dans un modèle de LAM FLT3-ITD hétérotopique, nous a permis de démontrer la plus grande efficacité du gilteritinib dans un modèle de LAM FLT3-ITD

plus physiologique, avec prise de greffe hématopoïétique. Ces résultats reproduisent donc le profil de sensibilité observé dans le premier article après « knock-down » d'AXL dans les cellules de LAM FLT3-ITD.

Enfin, le troisième article, qui nécessite de poursuivre les expérimentations *ex vivo* sur cellules primaires de patients LAM, nous a permis de démontrer des modifications de la localisation sub-cellulaire d'AXL en fonction du statut WT ou ITD du FLT3, de l'exposition aux chimiothérapies ou de co-cultures stromales. Nous avons démontré que la modification de cette localisation à la surface était un préalable à l'efficacité du traitement par anticorps anti-AXL *ex vivo* et que cette stratégie était applicable non seulement en association aux FLT3-ITK dans les LAM FLT3-ITD mais aussi en association avec la cytarabine indépendamment du statut FLT3 de la LAM.

CONCLUSION

Nos données ont permis de démontrer qu'AXL joue un rôle pivot dans la résistance des LAM FLT3-ITD aux FLT3-ITK par une convergence de signaux dépendants du microenvironnement médullaire. Ils aboutissent à sa surexpression et à son activation.

Ces résultats suggèrent que la double inhibition AXL/FLT3 permettra une meilleure efficacité que la simple inhibition de ce dernier. Ces mécanismes de régulation d'AXL ne semblent pas être spécifiques du statut FLT3-ITD de la LAM puisqu'ils ont été observés dans des cellules de LAM FLT3-WT et dans des progéniteurs hématopoïétiques normaux.

AXL semble donc être une cible thérapeutique prometteuse pour participer à l'éradication des LIC au sein de leur microenvironnement, en association à différentes stratégies, conventionnelles ou ciblées. Au-delà, la régulation transcriptionnelle d'AXL par STAT5 est une nouvelle voie de recherche dans d'autres modèles tumoraux tels que les cancers du sein et de la prostate dans lesquels ce facteur de transcription est aussi activé.

Ces travaux permettent donc d'envisager l'étude du rôle d'AXL dans la résistance des LIC aux chimiothérapies conventionnelles, indépendamment de la mutation du FLT3. Une étude va par ailleurs prochainement débuter à Bordeaux visant à étudier, *ex vivo* sur prélèvements frais, l'expression d'AXL dans la fraction la plus primitive des blastes de patients atteints de LAM au diagnostic. Cette étude vise à mesurer l'amplitude de cette surexpression dans les LIC de LAM et tenter de la rapporter aux différents sous-groupes moléculaires, notamment en regard des modificateurs épigénétiques.

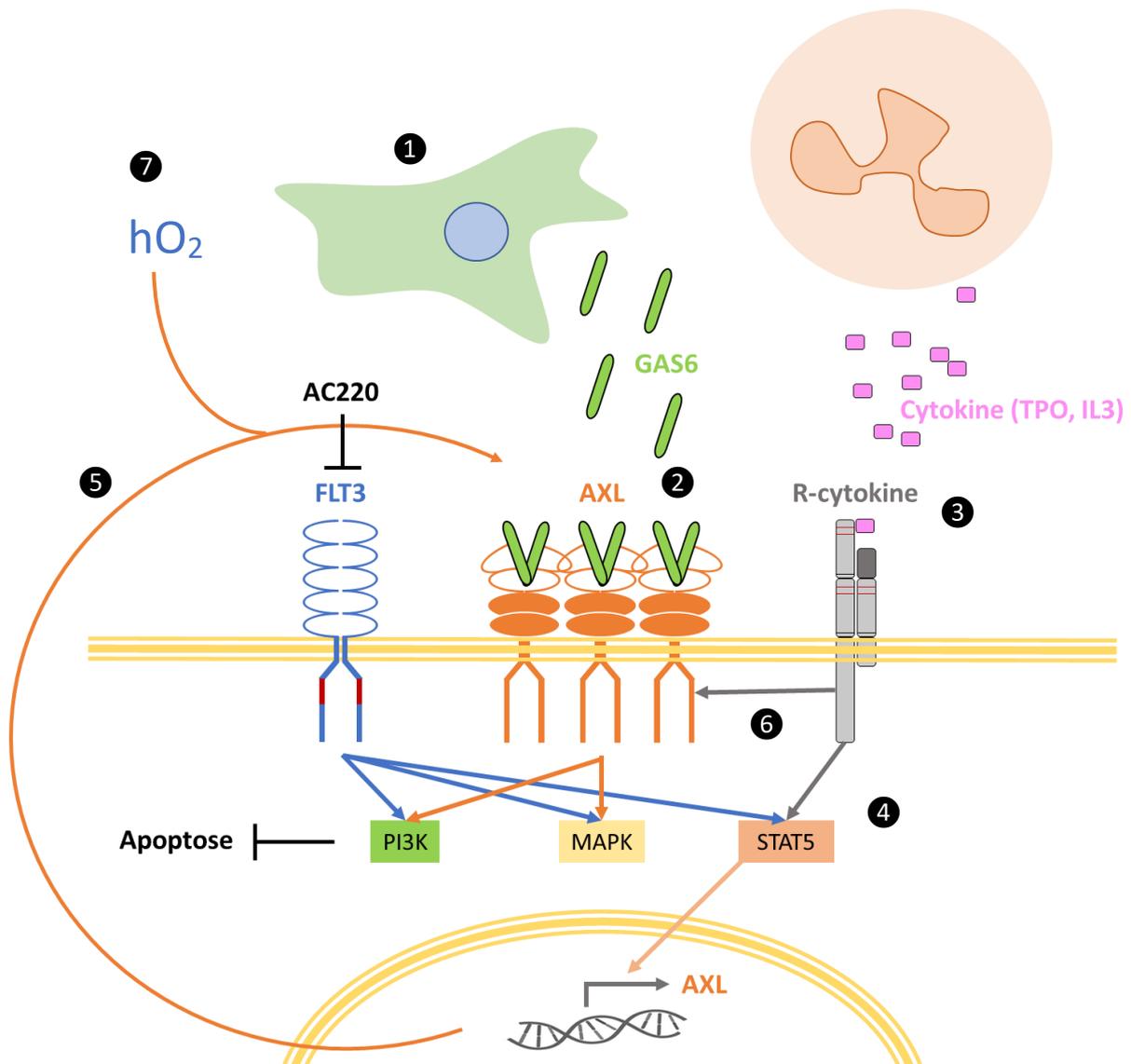


Figure 14 : Représentation schématique des principaux messages issus des travaux de ce doctorat. La présence de stroma ①, permet l'activation d'AXL grâce à la sécrétion de son ligand GAS6 ②. Les voies d'aval d'AXL participent aux mécanismes anti-apoptotiques médiés par le stroma en présence d'un FLT3-ITK (AC220). Par ailleurs, certaines cytokines ③ permettent, malgré la présence d'AC220, de maintenir une signalisation STAT5-dépendante ④ qui entraîne une surexpression d'AXL ⑤ et son activation ⑥ par l'intermédiaire d'un mécanisme non élucidé. Ce phénomène de surexpression protéique est amplifié en condition hypoxique ⑦.

BIBLIOGRAPHIE

1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(12):1136–1152.
2. Monnereau A, Remontet L, Maynadié M, et al. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012 Partie 2 – Hémopathies malignes. *Inst. Veille Sanit.* 2013:.
3. Gatta G, van der Zwan JM, Casali PG, et al. Rare cancers are not so rare: the rare cancer burden in Europe. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990.* 2011;47(17):2493–2511.
4. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129(4):424–447.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–2405.
6. Othus M, Kantarjian H, Petersdorf S, et al. Declining rates of treatment-related mortality in patients with newly diagnosed AML given “intense” induction regimens: a report from SWOG and MD Anderson. *Leukemia.* 2014;28(2):289–292.
7. Kantarjian H, O’Brien S, Cortes J, et al. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer.* 2006;106(5):1090–1098.
8. Klepin HD, Geiger AM, Tooze JA, et al. Geriatric assessment predicts survival for older adults receiving induction chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2013;121(21):4287–4294.
9. Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453–474.
10. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2012;30(36):4515–4523.
11. Röllig C, Bornhäuser M, Thiede C, et al. Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2011;29(20):2758–2765.
12. Kreiter H, Begemann H, Rastetter J. [Experiences with daunomycin and cytosine arabinoside in the therapy of acute myeloid leukemias]. *Med. Klin.* 1968;63(51):2058–2066.
13. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(13):1249–1259.
14. Löwenberg B, Ossenkoppele GJ, van Putten W, et al. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(13):1235–1248.
15. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, et al. A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m² vs 60 mg/m² in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients. *Blood.* 2015;125(25):3878–3885.

16. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, United Kingdom National Cancer Research Institute Acute Myeloid Leukemia Study Group. Higher daunorubicin exposure benefits FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(3):449–452.
17. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, et al. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2013;31(27):3360–3368.
18. Löwenberg B, Pabst T, Vellenga E, et al. Cytarabine dose for acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2011;364(11):1027–1036.
19. Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, et al. A randomized comparison of 4 courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus 3 courses of high-dose cytarabine alone in postremission therapy for acute myeloid leukemia in adults: the JALSG AML201 Study. *Blood*. 2011;117(8):2366–2372.
20. Schaich M, Röllig C, Soucek S, et al. Cytarabine dose of 36 g/m² compared with 12 g/m² within first consolidation in acute myeloid leukemia: results of patients enrolled onto the prospective randomized AML96 study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2011;29(19):2696–2702.
21. Magina KN, Pregartner G, Zebisch A, et al. Cytarabine dose in the consolidation treatment of AML - a systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2017;
22. Vellenga E, van Putten W, Ossenkoppele GJ, et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(23):6037–6042.
23. Cornelissen JJ, Versluis J, Passweg JR, et al. Comparative therapeutic value of post-remission approaches in patients with acute myeloid leukemia aged 40-60 years. *Leukemia*. 2015;29(5):1041–1050.
24. Pffirmann M, Ehninger G, Thiede C, et al. Prediction of post-remission survival in acute myeloid leukaemia: a post-hoc analysis of the AML96 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(2):207–214.
25. Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer*. 2007;109(6):1114–1124.
26. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*. 2015;126(3):291–299.
27. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2010;28(4):562–569.
28. Kornblith AB, Herndon JE, Silverman LR, et al. Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2002;20(10):2441–2452.
29. Welch JS, Petti AA, Miller CA, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2016;375(21):2023–2036.

30. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 1976;33(4):451–458.
31. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 1960;25:85–109.
32. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243(5405):290–293.
33. Rowley JD. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann. Genet.* 1973;16(2):109–112.
34. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1999;17(12):3835–3849.
35. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood.* 1998;92(7):2322–2333.
36. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood.* 2010;116(3):354–365.
37. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1996;10(12):1911–1918.
38. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* 2001;27(3):263–270.
39. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(3):254–266.
40. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2008;358(18):1909–1918.
41. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, et al. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature.* 2005;437(7055):147–153.
42. Bonetti P, Davoli T, Sironi C, et al. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma. *J. Cell Biol.* 2008;182(1):19–26.
43. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood.* 2005;106(3):899–902.
44. Colombo E, Bonetti P, Lazzarini Denchi E, et al. Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25(20):8874–8886.
45. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature.* 2013;502(7471):333–339.

46. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17(1):13–27.
47. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2017;35(9):934–946.
48. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(25):2424–2433.
49. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(12):1079–1089.
50. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(22):2059–2074.
51. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125(9):1367–1376.
52. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(23):2209–2221.
53. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(5):686–698.
54. Faber ZJ, Chen X, Gedman AL, et al. The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat. Genet.* 2016;48(12):1551–1556.
55. Silva P, Neumann M, Schroeder MP, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly is characterized by a distinct genetic and epigenetic landscape. *Leukemia*. 2017;
56. Guryanova OA, Shank K, Spitzer B, et al. DNMT3A mutations promote anthracycline resistance in acute myeloid leukemia via impaired nucleosome remodeling. *Nat. Med.* 2016;22(12):1488–1495.
57. Becker AJ, McCULLOCH EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452–454.
58. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
59. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645–648.
60. Cozzio A, Passegué E, Ayton PM, et al. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev.* 2003;17(24):3029–3035.
61. Laplane L. Cellule souche cancéreuse : réflexions épistémologiques. *Sociétés*. 2009/3(105):45–55.
62. Hill RP. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res.* 2006;66(4):1891–1895; discussion 1890.
63. Hill RP, Perris R. “Destemming” cancer stem cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 2007;99(19):1435–1440.
64. Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*. 2016;540(7633):433–437.
65. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):275–291.

66. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 1997;3(7):730–737.
67. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia.* 2000;14(10):1777–1784.
68. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat. Med.* 2006;12(10):1167–1174.
69. van Rhenen A, van Dongen GAMS, 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(7):2659–2666.
70. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, et al. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci. Transl. Med.* 2010;2(17):17ra9.
71. Hosen N, Park CY, Tatsumi N, et al. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104(26):11008–11013.
72. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell.* 2009;138(2):286–299.
73. Kersten B, Valkering M, Wouters R, et al. CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub-populations in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2016;173(2):219–235.
74. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;7(6):708–717.
75. Beerman I, Maloney WJ, Weissmann IL, Rossi DJ. Stem cells and the aging hematopoietic system. *Curr. Opin. Immunol.* 2010;22(4):500–506.
76. Busque L, Gilliland DG. X-inactivation analysis in the 1990s: promise and potential problems. *Leukemia.* 1998;12(2):128–135.
77. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(22):2289–2301.
78. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat. Genet.* 2012;44(11):1179–1181.
79. Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science.* 2015;347(6217):78–81.
80. Quesenberry PJ, Goldberg LR. Stem cell divisions and cancer. *Leukemia.* 2015;29(10):1959.
81. Potter JD, Prentice RL. Cancer risk: tumors excluded. *Science.* 2015;347(6223):727.
82. Ashford NA, Bauman P, Brown HS, et al. Cancer risk: role of environment. *Science.* 2015;347(6223):727.
83. Rozhok AI, Wahl GM, DeGregori J. A Critical Examination of the “Bad Luck” Explanation of Cancer Risk. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa.* 2015;8(9):762–764.
84. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(2):95–109.

85. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 2002;3(11):991–998.
86. Busch K, Klapproth K, Barile M, et al. Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo. *Nature.* 2015;518(7540):542–546.
87. Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, et al. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.* 2012;4(149):149ra118.
88. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014;506(7488):328–333.
89. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat. Med.* 2014;20(12):1472–1478.
90. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(26):2488–2498.
91. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(26):2477–2487.
92. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 2017;
93. Young AL, Challen GA, Birmann BM, Druley TE. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nat. Commun.* 2016;7:12484.
94. Estey E, Keating MJ, Pierce S, Stass S. Change in karyotype between diagnosis and first relapse in acute myelogenous leukemia. *Leukemia.* 1995;9(6):972–976.
95. Raghavan M, Smith L-L, Lillington DM, et al. Segmental uniparental disomy is a commonly acquired genetic event in relapsed acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008;112(3):814–821.
96. Parkin B, Ouilllette P, Li Y, et al. Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2013;121(2):369–377.
97. Shouval R, Shlush LI, Yehudai-Resheff S, et al. Single cell analysis exposes intratumor heterogeneity and suggests that FLT3-ITD is a late event in leukemogenesis. *Exp. Hematol.* 2014;42(6):457–463.
98. Vassiliou GS, Cooper JL, Rad R, et al. Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice. *Nat. Genet.* 2011;43(5):470–475.
99. Li L, Piloto O, Nguyen HB, et al. Knock-in of an internal tandem duplication mutation into murine FLT3 confers myeloproliferative disease in a mouse model. *Blood.* 2008;111(7):3849–3858.
100. Meyer SE, Qin T, Muench DE, et al. DNMT3A Haploinsufficiency Transforms FLT3ITD Myeloproliferative Disease into a Rapid, Spontaneous, and Fully Penetrant Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov.* 2016;6(5):501–515.
101. Deguchi K, Gilliland DG. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia.* 2002;16(4):740–744.
102. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood.* 2016;127(1):29–41.

103. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506–510.
104. Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(12):1090–1098.
105. Jan M, Majeti R. Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene*. 2013;32(2):135–140.
106. Li S, Garrett-Bakelman FE, Chung SS, et al. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* 2016;22(7):792–799.
107. Hirsch P, Zhang Y, Tang R, et al. Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nat. Commun.* 2016;7:12475.
108. Vago L, Perna SK, Zanussi M, et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(5):478–488.
109. da Silva-Coelho P, Kroeze LI, Yoshida K, et al. Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat. Commun.* 2017;8:15099.
110. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(10):883–892.
111. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell*. 1991;65(7):1143–1152.
112. Lyman SD, James L, Vanden Bos T, et al. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell*. 1993;75(6):1157–1167.
113. Adamia S, Bar-Natan M, Haibe-Kains B, et al. NOTCH2 and FLT3 gene mis-splicings are common events in patients with acute myeloid leukemia (AML): new potential targets in AML. *Blood*. 2014;123(18):2816–2825.
114. Griffith J, Black J, Faerman C, et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol. Cell*. 2004;13(2):169–178.
115. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood*. 2009;114(12):2386–2392.
116. Hannum C, Culpepper J, Campbell D, et al. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature*. 1994;368(6472):643–648.
117. Lisovsky M, Braun SE, Ge Y, et al. Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia*. 1996;10(6):1012–1018.
118. Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat. Rev. Cancer*. 2003;3(9):650–665.
119. Masson K, Rönstrand L. Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3. *Cell. Signal*. 2009;21(12):1717–1726.
120. Okamoto M, Hayakawa F, Miyata Y, et al. Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD. *Leukemia*. 2007;21(3):403–410.

121. Zhang S, Fukuda S, Lee Y, et al. Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J. Exp. Med.* 2000;192(5):719–728.
122. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 1996;184(5):1953–1962.
123. Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, et al. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood.* 1998;92(10):3647–3657.
124. Kuchenbauer F, Kern W, Schoch C, et al. Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2005;90(12):1617–1625.
125. Tarlock K, Alonzo TA, Loken MR, et al. Disease Characteristics and Prognostic Implications of Cell-Surface FLT3 Receptor (CD135) Expression in Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Report from the Children’s Oncology Group. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2017;
126. Piacibello W, Fubini L, Sanavio F, et al. Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood.* 1995;86(11):4105–4114.
127. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood.* 2002;100(1):59–66.
128. Breitenbuecher F, Schnittger S, Grundler R, et al. Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood.* 2009;113(17):4074–4077.
129. Zheng R, Bailey E, Nguyen B, et al. Further activation of FLT3 mutants by FLT3 ligand. *Oncogene.* 2011;30(38):4004–4014.
130. Choudhary C, Brandts C, Schwable J, et al. Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood.* 2007;110(1):370–374.
131. Schmidt-Arras D, Böhmer S-A, Koch S, et al. Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality. *Blood.* 2009;113(15):3568–3576.
132. Choudhary C, Olsen JV, Brandts C, et al. Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol. Cell.* 2009;36(2):326–339.
133. Schepers H, Wierenga ATJ, Vellenga E, Schuringa JJ. STAT5-mediated self-renewal of normal hematopoietic and leukemic stem cells. *JAK-STAT.* 2012;1(1):13–22.
134. Leischner H, Albers C, Grundler R, et al. SRC is a signaling mediator in FLT3-ITD- but not in FLT3-TKD-positive AML. *Blood.* 2012;119(17):4026–4033.
135. Chatterjee A, Ghosh J, Ramdas B, et al. Regulation of Stat5 by FAK and PAK1 in Oncogenic FLT3- and KIT-Driven Leukemogenesis. *Cell Rep.* 2014;9(4):1333–1348.
136. Sallmyr A, Fan J, Datta K, et al. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood.* 2008;111(6):3173–3182.

137. Gourdin TS, Zou Y, Ning Y, et al. High frequency of rare structural chromosome abnormalities at relapse of cytogenetically normal acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication. *Cancer Genet.* 2014;207(10–12):467–473.
138. Bertoli S, Boutzen H, David L, et al. CDC25A governs proliferation and differentiation of FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2015;6(35):38061–38078.
139. Li L, Osdal T, Ho Y, et al. SIRT1 activation by a c-MYC oncogenic network promotes the maintenance and drug resistance of human FLT3-ITD acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell.* 2014;15(4):431–446.
140. Müller TA, Grundler R, Istvanffy R, et al. Lineage-specific STAT5 target gene activation in hematopoietic progenitor cells predicts the FLT3(+)-mediated leukemic phenotype. *Leukemia.* 2016;30(8):1725–1733.
141. Kim K-T, Baird K, Ahn J-Y, et al. Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood.* 2005;105(4):1759–1767.
142. Rocnik JL, Okabe R, Yu J-C, et al. Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood.* 2006;108(4):1339–1345.
143. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, et al. Activating mutations of RTK/ras signal transduction pathway in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood.* 2003;102(4):1474–1479.
144. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(12):2213–2223.
145. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, et al. Clinical impact of FLT3 mutation load in acute promyelocytic leukemia with t(15;17)/PML-RARA. *Haematologica.* 2011;96(12):1799–1807.
146. Lucena-Araujo AR, Kim HT, Jacomo RH, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene confers poor overall survival in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy: an International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia study. *Ann. Hematol.* 2014;93(12):2001–2010.
147. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood.* 2001;98(6):1752–1759.
148. Daver N, Strati P, Jabbour E, et al. FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* 2013;88(1):56–59.
149. Gale RE, Lamb K, Allen C, et al. Simpson's Paradox and the Impact of Different DNMT3A Mutations on Outcome in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2015;33(18):2072–2083.
150. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood.* 2014;124(23):3441–3449.
151. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, et al. Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (exons 13-15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. *Genes. Chromosomes Cancer.* 2012;51(10):910–924.

152. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013;121(14):2734–2738.
153. Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326–4335.
154. Stirewalt DL, Pogossova-Agadjanyan EL, Tsuchiya K, Joaquin J, Meshinchi S. Copy-neutral loss of heterozygosity is prevalent and a late event in the pathogenesis of FLT3/ITD AML. *Blood Cancer J*. 2014;4:e208.
155. Cloos J, Goemans BF, Hess CJ, et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia*. 2006;20(7):1217–1220.
156. Garg M, Nagata Y, Kanojia D, et al. Profiling of somatic mutations in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD at diagnosis and relapse. *Blood*. 2015;126(22):2491–2501.
157. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, et al. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*. 2002;100(7):2393–2398.
158. Nazha A, Cortes J, Faderl S, et al. Activating internal tandem duplication mutations of the fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3-ITD) at complete response and relapse in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2012;97(8):1242–1245.
159. Tiesmeier J, Müller-Tidow C, Westermann A, et al. Evolution of FLT3-ITD and D835 activating point mutations in relapsing acute myeloid leukemia and response to salvage therapy. *Leuk. Res*. 2004;28(10):1069–1074.
160. Pratz KW, Sato T, Murphy KM, et al. FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML. *Blood*. 2010;115(7):1425–1432.
161. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, et al. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol*. 2001;113(4):983–988.
162. Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C, et al. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002;100(9):3423–3425.
163. Jiang J, Paez JG, Lee JC, et al. Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. *Blood*. 2004;104(6):1855–1858.
164. Kindler T, Breitenbuecher F, Kasper S, et al. Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2005;105(1):335–340.
165. Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, et al. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood*. 2006;107(9):3700–3707.
166. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science*. 2002;297(5578):63–64.
167. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007;8(11):1018–1029.

168. Smith CC, Wang Q, Chin C-S, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2012;485(7397):260–263.
169. Boyer SW, Beaudin AE, Forsberg EC. Mapping differentiation pathways from hematopoietic stem cells using Flk2/Flt3 lineage tracing. *Cell Cycle Georget. Tex.* 2012;11(17):3180–3188.
170. Chu SH, Heiser D, Li L, et al. FLT3-ITD knockin impairs hematopoietic stem cell quiescence/homeostasis, leading to myeloproliferative neoplasm. *Cell Stem Cell*. 2012;11(3):346–358.
171. Mead AJ, Neo WH, Barkas N, et al. Niche-mediated depletion of the normal hematopoietic stem cell reservoir by Flt3-ITD-induced myeloproliferation. *J. Exp. Med.* 2017;214(7):2005–2021.
172. Levis M. FLT3 dancing on the stem cell. *J. Exp. Med.* 2017;214(7):1857–1859.
173. Mahon F-X, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1029–1035.
174. Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood*. 2006;107(1):293–300.
175. Man CH, Fung TK, Ho C, et al. Sorafenib treatment of FLT3-ITD(+) acute myeloid leukemia: favorable initial outcome and mechanisms of subsequent nonresponsiveness associated with the emergence of a D835 mutation. *Blood*. 2012;119(22):5133–5143.
176. Baker SD, Zimmerman EI, Wang Y-D, et al. Emergence of polyclonal FLT3 tyrosine kinase domain mutations during sequential therapy with sorafenib and sunitinib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2013;19(20):5758–5768.
177. Galanis A, Ma H, Rajkhowa T, et al. Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. *Blood*. 2014;123(1):94–100.
178. Smith CC, Lasater EA, Lin KC, et al. Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(14):5319–5324.
179. Lee LY, Hernandez D, Rajkhowa T, et al. Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood*. 2017;129(2):257–260.
180. Smith CC, Zhang C, Lin KC, et al. Characterizing and Overriding the Structural Mechanism of the Quizartinib-Resistant FLT3 “Gatekeeper” F691L Mutation with PLX3397. *Cancer Discov.* 2015;5(6):668–679.
181. O’Farrell A-M, Foran JM, Fiedler W, et al. An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2003;9(15):5465–5476.
182. Fiedler W, Serve H, Döhner H, et al. A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood*. 2005;105(3):986–993.
183. Fiedler W, Kayser S, Kebenko M, et al. A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations. *Br. J. Haematol.* 2015;169(5):694–700.

184. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* 2008;26(1):127–132.
185. Thavasu P, Propper D, McDonald A, et al. The protein kinase C inhibitor CGP41251 suppresses cytokine release and extracellular signal-regulated kinase 2 expression in cancer patients. *Cancer Res.* 1999;59(16):3980–3984.
186. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell.* 2002;1(5):433–443.
187. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood.* 2005;105(1):54–60.
188. Fischer T, Stone RM, Deangelo DJ, et al. Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2010;28(28):4339–4345.
189. Stone RM, Fischer T, Paquette R, et al. Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012;26(9):2061–2068.
190. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* 2017;
191. Knapper S, Mills KI, Gilkes AF, et al. The effects of lestaurtinib (CEP701) and PKC412 on primary AML blasts: the induction of cytotoxicity varies with dependence on FLT3 signaling in both FLT3-mutated and wild-type cases. *Blood.* 2006;108(10):3494–3503.
192. Knapper S, Burnett AK, Littlewood T, et al. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood.* 2006;108(10):3262–3270.
193. Knapper S, Russell N, Gilkes A, et al. A randomized assessment of adding the kinase inhibitor lestaurtinib to first-line chemotherapy for FLT3-mutated AML. *Blood.* 2017;129(9):1143–1154.
194. Pratz KW, Cho E, Levis MJ, et al. A pharmacodynamic study of sorafenib in patients with relapsed and refractory acute leukemias. *Leukemia.* 2010;24(8):1437–1444.
195. Zhang W, Konopleva M, Shi Y, et al. Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 2008;100(3):184–198.
196. Röllig C, Serve H, Hüttmann A, et al. Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(16):1691–1699.
197. Metzelder SK, Schroeder T, Finck A, et al. High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with allo-immune effects to induce sustained responses. *Leukemia.* 2012;26(11):2353–2359.
198. Chen Y-B, Li S, Lane AA, et al. Phase I trial of maintenance sorafenib after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for fms-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication

acute myeloid leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 2014;20(12):2042–2048.

199. Brunner AM, Li S, Fathi AT, et al. Haematopoietic cell transplantation with and without sorafenib maintenance for patients with FLT3-ITD acute myeloid leukaemia in first complete remission. *Br. J. Haematol.* 2016;175(3):496–504.

200. Zorn JA, Wang Q, Fujimura E, Barros T, Kuriyan J. Crystal structure of the FLT3 kinase domain bound to the inhibitor Quizartinib (AC220). *PLoS One.* 2015;10(4):e0121177.

201. Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood.* 2009;114(14):2984–2992.

202. Cortes JE, Kantarjian H, Foran JM, et al. Phase I study of quizartinib administered daily to patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia irrespective of FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication status. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2013;31(29):3681–3687.

203. Cortes J. AC220 monotherapy efficacy (ACE) study in patients with acute myeloid leukemia (AML) with FLT3-ITD activating mutations: interim results. 2011;Abstract 1019:

204. Jorge E. Cortes. Final Results of a Phase 2 Open-Label, Monotherapy Efficacy and Safety Study of Quizartinib (AC220) in Patients \geq 60 Years of Age with FLT3 ITD Positive or Negative Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. 2012;Abstract 48:

205. Kampa-Schittenhelm KM, Heinrich MC, Akmut F, et al. Quizartinib (AC220) is a potent second generation class III tyrosine kinase inhibitor that displays a distinct inhibition profile against mutant-FLT3, -PDGFRA and -KIT isoforms. *Mol. Cancer.* 2013;12:19.

206. Jorge E. Cortes. Results Of a Phase 2 Randomized, Open-Label, Study Of Lower Doses Of Quizartinib (AC220; ASP2689) In Subjects With FLT3-ITD Positive Relapsed Or Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML). 2013;

207. Sexauer A, Perl A, Yang X, et al. Terminal myeloid differentiation in vivo is induced by FLT3 inhibition in FLT3/ITD AML. *Blood.* 2012;120(20):4205–4214.

208. Yang X, Sexauer A, Levis M. Bone marrow stroma-mediated resistance to FLT3 inhibitors in FLT3-ITD AML is mediated by persistent activation of extracellular regulated kinase. *Br. J. Haematol.* 2014;164(1):61–72.

209. Opatz S, Polzer H, Herold T, et al. Exome sequencing identifies recurring FLT3 N676K mutations in core-binding factor leukemia. *Blood.* 2013;122(10):1761–1769.

210. Jasleen K. Randhawa. Results of a Phase II Study of Crenolanib in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia Patients (Pts) with Activating FLT3 Mutations. ASH 2014:

211. Mori M, Kaneko N, Ueno Y, et al. Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Invest. New Drugs.* 2017;

212. Perl AE, Altman JK, Cortes J, et al. Selective inhibition of FLT3 by gilteritinib in relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a multicentre, first-in-human, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol.* 2017;

213. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* 2012;367(22):2075–2088.

214. Gozgit JM, Wong MJ, Wardwell S, et al. Potent activity of ponatinib (AP24534) in models of FLT3-driven acute myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Mol. Cancer Ther.* 2011;10(6):1028–1035.
215. Zirm E, Spies-Weisshart B, Heidel F, et al. Ponatinib may overcome resistance of FLT3-ITD harbouring additional point mutations, notably the previously refractory F691I mutation. *Br. J. Haematol.* 2012;157(4):483–492.
216. Smith CC, Lasater EA, Zhu X, et al. Activity of ponatinib against clinically-relevant AC220-resistant kinase domain mutants of FLT3-ITD. *Blood.* 2013;121(16):3165–3171.
217. Pratz KW, Cortes J, Roboz GJ, et al. A pharmacodynamic study of the FLT3 inhibitor KW-2449 yields insight into the basis for clinical response. *Blood.* 2009;113(17):3938–3946.
218. Arriba-Tutusaus P, Mack TS, Bullinger L, et al. Impact of FLT3-ITD location on sensitivity to TKI-therapy in vitro and in vivo. *Leukemia.* 2016;30(5):1220–1225.
219. Smith CC, Paguirigan A, Jeschke GR, et al. Heterogeneous resistance to quizartinib in acute myeloid leukemia (AML) revealed by single cell analysis. *Blood.* 2017;
220. Smith CC, Lin K, Stecula A, Sali A, Shah NP. FLT3 D835 mutations confer differential resistance to type II FLT3 inhibitors. *Leukemia.* 2015;29(12):2390–2392.
221. Puissant A, Fenouille N, Alexe G, et al. SYK is a critical regulator of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2014;25(2):226–242.
222. Hahn CK, Berchuck JE, Ross KN, et al. Proteomic and genetic approaches identify Syk as an AML target. *Cancer Cell.* 2009;16(4):281–294.
223. Nabinger SC, Li XJ, Ramdas B, et al. The protein tyrosine phosphatase, Shp2, positively contributes to FLT3-ITD-induced hematopoietic progenitor hyperproliferation and malignant disease in vivo. *Leukemia.* 2013;27(2):398–408.
224. Richine BM, Virts EL, Bowling JD, et al. Syk kinase and Shp2 phosphatase inhibition cooperate to reduce FLT3-ITD-induced STAT5 activation and proliferation of acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2016;30(10):2094–2097.
225. Ghosh AK, Secreto C, Boysen J, et al. The novel receptor tyrosine kinase Axl is constitutively active in B-cell chronic lymphocytic leukemia and acts as a docking site of nonreceptor kinases: implications for therapy. *Blood.* 2011;117(6):1928–1937.
226. Gioia R, Leroy C, Drullion C, et al. Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells. *Blood.* 2011;118(8):2211–2221.
227. Keeton EK, McEachern K, Dillman KS, et al. AZD1208, a potent and selective pan-Pim kinase inhibitor, demonstrates efficacy in preclinical models of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2014;123(6):905–913.
228. Green AS, Maciel TT, Hospital M-A, et al. Pim kinases modulate resistance to FLT3 tyrosine kinase inhibitors in FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Sci. Adv.* 2015;1(8):e1500221.
229. Doshi KA, Trotta R, Natarajan K, et al. Pim kinase inhibition sensitizes FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells to topoisomerase 2 inhibitors through increased DNA damage and oxidative stress. *Oncotarget.* 2016;7(30):48280–48295.

230. Yuan LL, Green AS, Bertoli S, et al. Pim kinases phosphorylate Chk1 and regulate its functions in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014;28(2):293–301.
231. Yuan LL, Green A, David L, et al. Targeting CHK1 inhibits cell proliferation in FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 2014;38(11):1342–1349.
232. Kohl TM, Hellinger C, Ahmed F, et al. BH3 mimetic ABT-737 neutralizes resistance to FLT3 inhibitor treatment mediated by FLT3-independent expression of BCL2 in primary AML blasts. *Leukemia*. 2007;21(8):1763–1772.
233. Kasper S, Breitenbuecher F, Heidel F, et al. Targeting MCL-1 sensitizes FLT3-ITD-positive leukemias to cytotoxic therapies. *Blood Cancer J.* 2012;2(3):e60.
234. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 2017;
235. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4(1–2):7–25.
236. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121(7):1109–1121.
237. Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature.* 2015;526(7571):126–130.
238. Asada N, Kunisaki Y, Pierce H, et al. Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. *Nat. Cell Biol.* 2017;19(3):214–223.
239. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature.* 2014;505(7483):327–334.
240. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature.* 2013;495(7440):231–235.
241. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity.* 2010;33(3):387–399.
242. Sungaran R, Chisholm OT, Markovic B, et al. The role of platelet alpha-granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. *Blood.* 2000;95(10):3094–3101.
243. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;6(3):251–264.
244. Winkler IG, Barbier V, Nowlan B, et al. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat. Med.* 2012;18(11):1651–1657.
245. Ito K, Turcotte R, Cui J, et al. Self-renewal of a purified Tie2+ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science.* 2016;354(6316):1156–1160.
246. Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Fujioka M, Suda T. Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014;454(2):353–357.
247. Bruns I, Lucas D, Pinho S, et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat. Med.* 2014;20(11):1315–1320.

248. Zhao M, Perry JM, Marshall H, et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 2014;20(11):1321–1326.
249. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425(6960):841–846.
250. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature.* 2013;502(7473):637–643.
251. Zhu J, Garrett R, Jung Y, et al. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood.* 2007;109(9):3706–3712.
252. Wu JY, Purton LE, Rodda SJ, et al. Osteoblastic regulation of B lymphopoiesis is mediated by Gs{alpha}-dependent signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105(44):16976–16981.
253. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature.* 2012;481(7382):457–462.
254. Greenbaum A, Hsu Y-MS, Day RB, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature.* 2013;495(7440):227–230.
255. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell.* 2007;1(6):685–697.
256. Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007;1(6):671–684.
257. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature.* 2014;508(7495):269–273.
258. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol.* 2009;219(2):271–275.
259. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature.* 2016;532(7599):323–328.
260. Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, et al. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2013;12(1):49–61.
261. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, et al. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat. Cell Biol.* 2013;15(5):533–543.
262. Pedersen M, Löfstedt T, Sun J, et al. Stem cell factor induces HIF-1alpha at normoxia in hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;377(1):98–103.
263. Kirito K, Fox N, Komatsu N, Kaushansky K. Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1alpha. *Blood.* 2005;105(11):4258–4263.
264. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature.* 2005;435(7044):969–973.
265. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, et al. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science.* 2008;322(5909):1861–1865.

266. Santaguida M, Schepers K, King B, et al. JunB protects against myeloid malignancies by limiting hematopoietic stem cell proliferation and differentiation without affecting self-renewal. *Cancer Cell*. 2009;15(4):341–352.
267. Lane SW, Wang YJ, Lo Celso C, et al. Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia progression. *Blood*. 2011;118(10):2849–2856.
268. Krause DS, Lazarides K, von Andrian UH, Van Etten RA. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nat. Med*. 2006;12(10):1175–1180.
269. Carey A, Edwards DK, Eide CA, et al. Identification of Interleukin-1 by Functional Screening as a Key Mediator of Cellular Expansion and Disease Progression in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep*. 2017;18(13):3204–3218.
270. Volk A, Li J, Xin J, et al. Co-inhibition of NF- κ B and JNK is synergistic in TNF-expressing human AML. *J. Exp. Med*. 2014;211(6):1093–1108.
271. Arranz L, Sánchez-Aguilera A, Martín-Pérez D, et al. Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature*. 2014;512(7512):78–81.
272. Ellegast JM, Rauch PJ, Kovtonyuk LV, et al. inv(16) and NPM1mut AMLs engraft human cytokine knock-in mice. *Blood*. 2016;128(17):2130–2134.
273. Carretta M, de Boer B, Jaques J, et al. Genetically engineered mesenchymal stromal cells producing IL3 and TPO to further improve human scaffold-based xenograft models. *Exp. Hematol*. 2017;
274. Cauchy P, James SR, Zacarias-Cabeza J, et al. Chronic FLT3-ITD Signaling in Acute Myeloid Leukemia Is Connected to a Specific Chromatin Signature. *Cell Rep*. 2015;12(5):821–836.
275. Angelini DF, Ottone T, Guerrero G, et al. A Leukemia-Associated CD34/CD123/CD25/CD99+ Immunophenotype Identifies FLT3-Mutated Clones in Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 2015;21(17):3977–3985.
276. Höckendorf U, Yabal M, Herold T, et al. RIPK3 Restricts Myeloid Leukemogenesis by Promoting Cell Death and Differentiation of Leukemia Initiating Cells. *Cancer Cell*. 2016;30(1):75–91.
277. Stucki A, Rivier AS, Gikic M, et al. Endothelial cell activation by myeloblasts: molecular mechanisms of leukostasis and leukemic cell dissemination. *Blood*. 2001;97(7):2121–2129.
278. Hanoun M, Zhang D, Mizoguchi T, et al. Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2014;15(3):365–375.
279. Flores-Figueroa E, Varma S, Montgomery K, Greenberg PL, Gratzinger D. Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol*. 2012;92(9):1330–1341.
280. Ge J, Hou R, Liu Q, Zhu R, Liu K. Stromal-derived factor-1 deficiency in the bone marrow of acute myeloid leukemia. *Int. J. Hematol*. 2011;93(6):750–759.
281. Ben-Batalla I, Schultze A, Wroblewski M, et al. Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood*. 2013;122(14):2443–2452.

282. Shafat MS, Oellerich T, Mohr S, et al. Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. *Blood*. 2017;129(10):1320–1332.
283. Raaijmakers MHGP, Mukherjee S, Guo S, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010;464(7290):852–857.
284. Zambetti NA, Ping Z, Chen S, et al. Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):613–627.
285. Dong L, Yu W-M, Zheng H, et al. Leukaemogenic effects of Ptpn11 activating mutations in the stem cell microenvironment. *Nature*. 2016;539(7628):304–308.
286. Wang L, Zhang H, Rodriguez S, et al. Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF- κ B-dependent manner. *Cell Stem Cell*. 2014;15(1):51–65.
287. Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, et al. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell*. 2007;129(6):1097–1110.
288. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, et al. Leukaemogenesis induced by an activating β -catenin mutation in osteoblasts. *Nature*. 2014;506(7487):240–244.
289. Kode A, Mosialou I, Manavalan SJ, et al. FoxO1-dependent induction of acute myeloid leukemia by osteoblasts in mice. *Leukemia*. 2016;30(1):1–13.
290. Sato T, Yang X, Knapper S, et al. FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo. *Blood*. 2011;117(12):3286–3293.
291. Zhou J, Bi C, Janakakumara JV, et al. Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML. *Blood*. 2009;113(17):4052–4062.
292. Dong-Feng Z, Ting L, Yong Z, et al. The TPO/c-MPL pathway in the bone marrow may protect leukemia cells from chemotherapy in AML Patients. *Pathol. Oncol. Res. POR*. 2014;20(2):309–317.
293. Rauch PJ, Ellegast JM, Widmer CC, et al. MPL expression on AML blasts predicts peripheral blood neutropenia and thrombocytopenia. *Blood*. 2016;128(18):2253–2257.
294. Takeshita A, Shinjo K, Izumi M, et al. Quantitative expression of thrombopoietin receptor on leukaemia cells from patients with acute myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol*. 1998;100(2):283–290.
295. Wetzler M, Baer MR, Bernstein SH, et al. Expression of c-mpl mRNA, the receptor for thrombopoietin, in acute myeloid leukemia blasts identifies a group of patients with poor response to intensive chemotherapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol*. 1997;15(6):2262–2268.
296. Corazza F, Hermans C, D’Hondt S, et al. Circulating thrombopoietin as an in vivo growth factor for blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;107(6):2525–2530.
297. Pulikkan JA, Madera D, Xue L, et al. Thrombopoietin/MPL participates in initiating and maintaining RUNX1-ETO acute myeloid leukemia via PI3K/AKT signaling. *Blood*. 2012;120(4):868–879.

298. Chou F-S, Griesinger A, Wunderlich M, et al. The thrombopoietin/MPL/Bcl-xL pathway is essential for survival and self-renewal in human preleukemia induced by AML1-ETO. *Blood*. 2012;120(4):709–719.
299. Riccioni R, Diverio D, Riti V, et al. Interleukin (IL)-3/granulocyte macrophage-colony stimulating factor/IL-5 receptor alpha and beta chains are preferentially expressed in acute myeloid leukaemias with mutated FMS-related tyrosine kinase 3 receptor. *Br. J. Haematol*. 2009;144(3):376–387.
300. Vergez F, Green AS, Tamburini J, et al. High levels of CD34+CD38low/-CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucemies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) study. *Haematologica*. 2011;96(12):1792–1798.
301. Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, et al. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood*. 2009;113(24):6206–6214.
302. Karjalainen R, Pemovska T, Popa M, et al. JAK1/2 and BCL2 inhibitors synergize to counteract bone marrow stromal cell-induced protection of AML. *Blood*. 2017;
303. Casetti L, Martin-Lannerée S, Najjar I, et al. Differential contributions of STAT5A and STAT5B to stress protection and tyrosine kinase inhibitor resistance of chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells. *Cancer Res*. 2013;73(7):2052–2058.
304. Dias S, Hattori K, Zhu Z, et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J. Clin. Invest*. 2000;106(4):511–521.
305. Piya S, Kornblau SM, Ruvolo VR, et al. Atg7 suppression enhances chemotherapeutic agent sensitivity and overcomes stroma-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(9):1260–1269.
306. Braun M, Qorraj M, Büttner M, et al. CXCL12 promotes glycolytic reprogramming in acute myeloid leukemia cells via the CXCR4/mTOR axis. *Leukemia*. 2016;30(8):1788–1792.
307. Moschoi R, Imbert V, Nebout M, et al. Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood*. 2016;128(2):253–264.
308. Pezeshkian B, Donnelly C, Tamburo K, Geddes T, Madlambayan GJ. Leukemia Mediated Endothelial Cell Activation Modulates Leukemia Cell Susceptibility to Chemotherapy through a Positive Feedback Loop Mechanism. *PLoS One*. 2013;8(4):e60823.
309. Parmar A, Marz S, Rushton S, et al. Stromal niche cells protect early leukemic FLT3-ITD+ progenitor cells against first-generation FLT3 tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2011;71(13):4696–4706.
310. Charaf L, Mahon F-X, Lamrissi-Garcia I, et al. Effect of tyrosine kinase inhibitors on stemness in normal and chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2017;31(1):65–74.
311. Giustacchini A, Thongjuea S, Barkas N, et al. Single-cell transcriptomics uncovers distinct molecular signatures of stem cells in chronic myeloid leukemia. *Nat. Med*. 2017;23(6):692–702.
312. Fluegen G, Avivar-Valderas A, Wang Y, et al. Phenotypic heterogeneity of disseminated tumour cells is preset by primary tumour hypoxic microenvironments. *Nat. Cell Biol*. 2017;19(2):120–132.
313. Frolova O, Samudio I, Benito JM, et al. Regulation of HIF-1 α signaling and chemoresistance in acute lymphocytic leukemia under hypoxic conditions of the bone marrow microenvironment. *Cancer Biol. Ther*. 2012;13(10):858–870.

314. Wang Y, Liu Y, Malek SN, Zheng P, Liu Y. Targeting HIF1 α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell*. 2011;8(4):399–411.
315. Sironi S, Wagner M, Kuett A, et al. Microenvironmental hypoxia regulates FLT3 expression and biology in AML. *Sci. Rep.* 2015;5:17550.
316. Jin L, Tabe Y, Lu H, et al. Mechanisms of apoptosis induction by simultaneous inhibition of PI3K and FLT3-ITD in AML cells in the hypoxic bone marrow microenvironment. *Cancer Lett.* 2013;329(1):45–58.
317. Liu E, Hjelle B, Bishop JM. Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988;85(6):1952–1956.
318. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, et al. axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1991;11(10):5016–5031.
319. Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, et al. A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene*. 1991;6(11):2113–2120.
320. Rescigno J, Mansukhani A, Basilico C. A putative receptor tyrosine kinase with unique structural topology. *Oncogene*. 1991;6(10):1909–1913.
321. Revil T, Toutant J, Shkreta L, et al. Protein kinase C-dependent control of Bcl-x alternative splicing. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27(24):8431–8441.
322. Kariolis MS, Miao YR, Diep A, et al. Inhibition of the GAS6/AXL pathway augments the efficacy of chemotherapies. *J. Clin. Invest.* 2017;127(1):183–198.
323. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005;105(2):659–669.
324. Mimura I, Nangaku M, Kanki Y, et al. Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A. *Mol. Cell. Biol.* 2012;32(15):3018–3032.
325. Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, et al. Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(37):13373–13378.
326. Mudduluru G, Vajkoczy P, Allgayer H. Myeloid zinc finger 1 induces migration, invasion, and in vivo metastasis through Axl gene expression in solid cancer. *Mol. Cancer Res. MCR*. 2010;8(2):159–169.
327. Mudduluru G, Allgayer H. The human receptor tyrosine kinase Axl gene--promoter characterization and regulation of constitutive expression by Sp1, Sp3 and CpG methylation. *Biosci. Rep.* 2008;28(3):161–176.
328. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MBA, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*. 2007;131(6):1124–1136.
329. Dufies M, Jacquelin A, Belhacene N, et al. Mechanisms of AXL overexpression and function in Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. 2011;2(11):874–885.
330. Xu MZ, Chan SW, Liu AM, et al. AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2011;30(10):1229–1240.

331. Liu R, Gong M, Li X, et al. Induction, regulation, and biologic function of Axl receptor tyrosine kinase in Kaposi sarcoma. *Blood*. 2010;116(2):297–305.
332. Hong C-C, Lay J-D, Huang J-S, et al. Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Lett*. 2008;268(2):314–324.
333. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298(5600):1912–1934.
334. Lu Q, Gore M, Zhang Q, et al. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*. 1999;398(6729):723–728.
335. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*. 2001;293(5528):306–311.
336. Linger RMA, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv. Cancer Res*. 2008;100:35–83.
337. Stitt TN, Conn G, Gore M, et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*. 1995;80(4):661–670.
338. Fisher PW, Brigham-Burke M, Wu S-J, et al. A novel site contributing to growth-arrest-specific gene 6 binding to its receptors as revealed by a human monoclonal antibody. *Biochem. J*. 2005;387(Pt 3):727–735.
339. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103(2):211–225.
340. Tsou W-I, Nguyen K-QN, Calarese DA, et al. Receptor tyrosine kinases, TYRO3, AXL, and MER, demonstrate distinct patterns and complex regulation of ligand-induced activation. *J. Biol. Chem*. 2014;289(37):25750–25763.
341. Lew ED, Oh J, Burrola PG, et al. Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *eLife*. 2014;3:.
342. Zagórska A, Través PG, Lew ED, Dransfield I, Lemke G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat. Immunol*. 2014;15(10):920–928.
343. Caberoy NB, Zhou Y, Li W. Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J*. 2010;29(23):3898–3910.
344. Caberoy NB, Li W. Unconventional secretion of tubby and tubby-like protein 1. *FEBS Lett*. 2009;583(18):3057–3062.
345. Fukumori T, Kanayama H-O, Raz A. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother*. 2007;10(3):101–108.
346. Caberoy NB, Alvarado G, Bigcas J-L, Li W. Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal. *J. Cell. Physiol*. 2012;227(2):401–407.
347. Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, Griffioen AW. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015;1855(2):235–247.

348. Cheng C-L, Hou H-A, Lee M-C, et al. Higher bone marrow LGALS3 expression is an independent unfavorable prognostic factor for overall survival in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(16):3172–3180.
349. Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, et al. Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(42):17468–17473.
350. Fei F, Joo EJ, Tarighat SS, et al. B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and stromal cells communicate through Galectin-3. *Oncotarget*. 2015;6(13):11378–11394.
351. Krause S, Pfeiffer C, Strube S, et al. Mer tyrosine kinase promotes the survival of t(1;19)-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL) in the central nervous system (CNS). *Blood*. 2015;125(5):820–830.
352. Ikemori RY, Machado CML, Furuzawa KM, et al. Galectin-3 up-regulation in hypoxic and nutrient deprived microenvironments promotes cell survival. *PloS One*. 2014;9(11):e111592.
353. Burchert A, Attar EC, McCloskey P, Fridell YW, Liu ET. Determinants for transformation induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1998;16(24):3177–3187.
354. Bellosta P, Costa M, Lin DA, Basilico C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15(2):614–625.
355. Gioia R, Trégoat C, Dumas P-Y, et al. CBL controls a tyrosine kinase network involving AXL, SYK and LYN in nilotinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *J. Pathol.* 2015;237(1):14–24.
356. D’Arcangelo D, Ambrosino V, Giannuzzo M, Gaetano C, Capogrossi MC. Axl receptor activation mediates laminar shear stress anti-apoptotic effects in human endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 2006;71(4):754–763.
357. Gusenbauer S, Vlaicu P, Ullrich A. HGF induces novel EGFR functions involved in resistance formation to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2013;32(33):3846–3856.
358. Pierce A, Bliesner B, Xu M, et al. Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 2008;22(11):2481–2495.
359. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2007;178(9):5635–5642.
360. Park I-K, Trotta R, Yu J, Caligiuri MA. Axl/Gas6 pathway positively regulates FLT3 activation in human natural killer cell development. *Eur. J. Immunol.* 2013;43(10):2750–2755.
361. Park I-K, Mishra A, Chandler J, et al. Inhibition of the receptor tyrosine kinase Axl impedes activation of the FLT3 internal tandem duplication in human acute myeloid leukemia: implications for Axl as a potential therapeutic target. *Blood*. 2013;121(11):2064–2073.
362. Park I-K, Giovenzana C, Hughes TL, et al. The Axl/Gas6 pathway is required for optimal cytokine signaling during human natural killer cell development. *Blood*. 2009;113(11):2470–2477.
363. Fridell YW, Jin Y, Quilliam LA, et al. Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1996;16(1):135–145.

364. Graham DK, DeRyckere D, Davies KD, Earp HS. The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2014;14(12):769–785.
365. Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, et al. Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2010;185(4):2044–2050.
366. Caraux A, Lu Q, Fernandez N, et al. Natural killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. *Nat. Immunol*. 2006;7(7):747–754.
367. Paolino M, Choidas A, Wallner S, et al. The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells. *Nature*. 2014;507(7493):508–512.
368. Carrera Silva EA, Chan PY, Joannas L, et al. T cell-derived protein S engages TAM receptor signaling in dendritic cells to control the magnitude of the immune response. *Immunity*. 2013;39(1):160–170.
369. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J. Clin. Invest*. 2005;115(2):237–246.
370. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat. Med*. 2001;7(2):215–221.
371. Melaragno MG, Cavet ME, Yan C, et al. Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2004;37(4):881–887.
372. Fridell YW, Villa J, Attar EC, Liu ET. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem*. 1998;273(12):7123–7126.
373. Neubauer A, Fiebeler A, Graham DK, et al. Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood*. 1994;84(6):1931–1941.
374. Paccez JD, Vasques GJ, Correa RG, et al. The receptor tyrosine kinase Axl is an essential regulator of prostate cancer proliferation and tumor growth and represents a new therapeutic target. *Oncogene*. 2013;32(6):689–698.
375. Zhang Y, Tang Y-J, Man Y, et al. Knockdown of AXL receptor tyrosine kinase in osteosarcoma cells leads to decreased proliferation and increased apoptosis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol*. 2013;26(1):179–188.
376. Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, et al. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J. Cell. Physiol*. 2005;204(1):36–44.
377. Byers LA, Diao L, Wang J, et al. An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 2013;19(1):279–290.
378. Asiedu MK, Beauchamp-Perez FD, Ingle JN, et al. AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogene*. 2014;33(10):1316–1324.
379. Ott M, Litzénburger UM, Sahm F, et al. Promotion of glioblastoma cell motility by enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is mediated by AXL receptor kinase. *PLoS One*. 2012;7(10):e47663.

380. Mishra A, Wang J, Shiozawa Y, et al. Hypoxia stabilizes GAS6/Axl signaling in metastatic prostate cancer. *Mol. Cancer Res. MCR*. 2012;10(6):703–712.
381. Shiozawa Y, Pedersen EA, Patel LR, et al. GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche. *Neoplasia N. Y. N.* 2010;12(2):116–127.
382. Heckmann D, Maier P, Laufs S, et al. The disparate twins: a comparative study of CXCR4 and CXCR7 in SDF-1 α -induced gene expression, invasion and chemosensitivity of colon cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2014;20(3):604–616.
383. Kim K-C, Baek S-H, Lee C. Curcumin-induced downregulation of Axl receptor tyrosine kinase inhibits cell proliferation and circumvents chemoresistance in non-small lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2015;47(6):2296–2303.
384. Zhang Z, Lee JC, Lin L, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat. Genet.* 2012;44(8):852–860.
385. Mahadevan D, Cooke L, Riley C, et al. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*. 2007;26(27):3909–3919.
386. Liu L, Greger J, Shi H, et al. Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res.* 2009;69(17):6871–6878.
387. Hsieh M-S, Yang P-W, Wong L-F, Lee J-M. The AXL receptor tyrosine kinase is associated with adverse prognosis and distant metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(24):36956–36970.
388. Brand TM, Iida M, Stein AP, et al. AXL mediates resistance to cetuximab therapy. *Cancer Res.* 2014;74(18):5152–5164.
389. Aguilera TA, Rafat M, Castellini L, et al. Reprogramming the immunological microenvironment through radiation and targeting Axl. *Nat. Commun.* 2016;7:13898.
390. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2017;168(3):542.
391. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674.
392. Rochlitz C, Lohri A, Bacchi M, et al. Axl expression is associated with adverse prognosis and with expression of Bcl-2 and CD34 in de novo acute myeloid leukemia (AML): results from a multicenter trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Leukemia*. 1999;13(9):1352–1358.
393. Whitman SP, Kohlschmidt J, Maharry K, et al. GAS6 expression identifies high-risk adult AML patients: potential implications for therapy. *Leukemia*. 2014;28(6):1252–1258.
394. Park I-K, Mundy-Bosse B, Whitman SP, et al. Receptor tyrosine kinase Axl is required for resistance of leukemic cells to FLT3-targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(12):2382–2389.
395. Myers SH, Brunton VG, Unciti-Broceta A. AXL Inhibitors in Cancer: A Medicinal Chemistry Perspective. *J. Med. Chem.* 2016;59(8):3593–3608.
396. Economides AN, Carpenter LR, Rudge JS, et al. Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat. Med.* 2003;9(1):47–52.

397. Leconet W, Larbouret C, Chardès T, et al. Preclinical validation of AXL receptor as a target for antibody-based pancreatic cancer immunotherapy. *Oncogene*. 2014;33(47):5405–5414.
398. Leconet W, Chentouf M, du Manoir S, et al. Therapeutic Activity of Anti-AXL Antibody against Triple-Negative Breast Cancer Patient-Derived Xenografts and Metastasis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2016;
399. Dahl ME, Arai KI, Watanabe S. Association of Lyn tyrosine kinase to the GM-CSF and IL-3 receptor common betac subunit and role of Src tyrosine kinases in DNA synthesis and anti-apoptosis. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 2000;5(2):143–153.
400. Lannutti BJ, Drachman JG. Lyn tyrosine kinase regulates thrombopoietin-induced proliferation of hematopoietic cell lines and primary megakaryocytic progenitors. *Blood*. 2004;103(10):3736–3743.
401. Fiegl M, Samudio I, Clise-Dwyer K, et al. CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure. *Blood*. 2009;113(7):1504–1512.
402. Kuett A, Rieger C, Perathoner D, et al. IL-8 as mediator in the microenvironment-leukaemia network in acute myeloid leukaemia. *Sci. Rep.* 2015;5:18411.

Niveaux d'expression de TULP1 et de TUBBY dans différents modèles de cancers selon les données du TCGA.⁵⁰

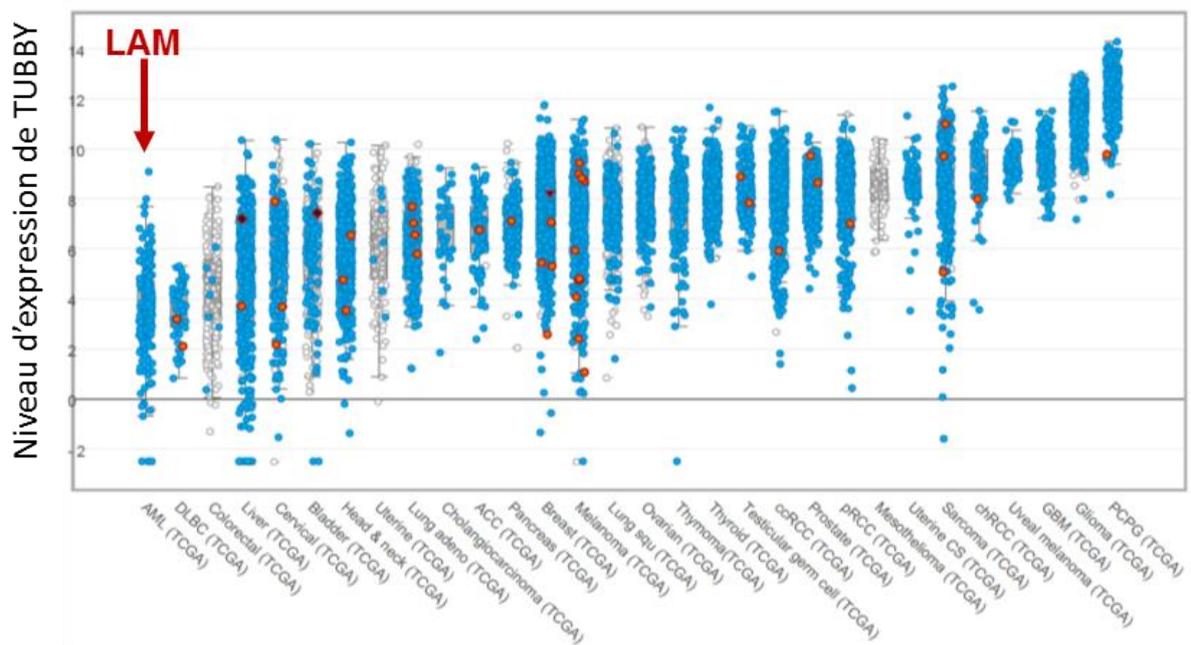
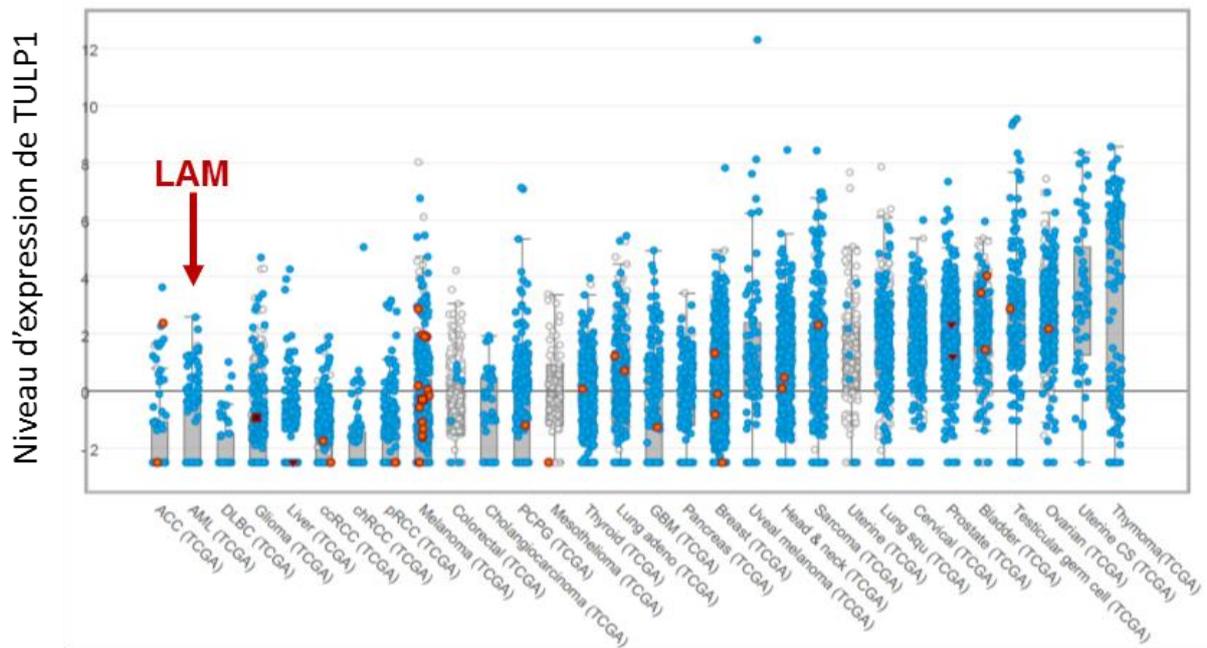


TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	17
I. Les Leucémies Aiguës Myéloblastiques.....	17
A. Généralités.....	17
1. Aspects épidémiologiques.....	17
2. Aspects diagnostiques.....	18
3. Aspects thérapeutiques.....	18
a. Facteurs pronostiques.....	18
b. Chimiothérapie d'induction.....	21
c. Stratégies de post-rémission.....	22
d. Stratégies de traitements non-intensifs.....	23
B. Classifications des LAM.....	25
1. Caractérisation cytologique.....	25
2. Caractérisation cytogénétique.....	25
3. Caractérisation moléculaire.....	26
C. Phylogénie des LAM.....	32
1. Cellule souche cancéreuse.....	32
2. Hématopoïèse pré-leucémique.....	33
3. Evolution clonale.....	36
D. Le récepteur tyrosine kinase Fms-like tyrosine kinase 3.....	43
1. Rôle du FLT3 dans l'hématopoïèse normale.....	43
2. Rôle du FLT3 dans les LAM.....	47
a. Les mutations de type FLT3-ITD.....	48
i. Evènement génétique.....	48
ii. Conséquences conformationnelles.....	48
iii. Conséquences sur la signalisation.....	49
iv. Prévalence dans les LAM.....	51
v. Valeur pronostique.....	51
vi. Arbre phylogénétique.....	52
b. Les mutations ponctuelles du FLT3.....	53
3. Inhibiteurs de tyrosine kinase dans les LAM FLT3 mutées.....	54
a. Pertinence du ciblage thérapeutique des anomalies de type FLT3-ITD.....	54
b. Les différentes classes d'inhibiteurs de tyrosine kinase.....	56

i.	Les FLT3-ITK de première génération	58
ii.	Les FLT3-ITK de deuxième génération.....	60
c.	Les mécanismes de résistance aux FLT3-ITK.....	64
i.	Extrinsèques à la cellule leucémique	64
ii.	Intrinsèques à la cellule leucémique.....	65
II.	Microenvironnement médullaire	70
A.	Niche hématopoïétique.....	70
1.	Composante cellulaire.....	71
2.	Composante soluble.....	74
3.	Composante hypoxique	74
B.	Niche leucémique	77
1.	Rôle permissif.....	77
2.	Rôle conducteur.....	79
3.	Rôle protecteur et mécanismes de résistance extrinsèques	80
a.	Rôle des facteurs solubles	81
b.	Rôle des interactions cellule-cellule et cellule-MEC.....	82
c.	Rôle des basses pressions en O ₂	83
III.	AXL et les récepteurs TAM	85
A.	Fonctions physiologiques des RTAM	85
1.	Généralités.....	85
2.	Activation des RTAM.....	87
a.	Ligands canoniques et putatifs	87
i.	GAS6 et PROS1	87
ii.	TUBBY et TULP1.....	88
iii.	Galectine 3.....	89
b.	Voies de signalisation et conséquences de l'activation des RTAM.....	90
3.	Rôles des RTAM.....	93
a.	Immunité innée.....	93
b.	Autres fonctions	94
B.	Fonctions physiopathologiques des RTAM en Oncologie.....	96
1.	Biologie des RTAM dans les cellules tumorales.....	96
2.	Biologie d'AXL dans les LAM.....	99
3.	Stratégies d'inhibition d'AXL	101

a.	Inhibiteurs de tyrosine kinase anti-AXL.....	101
b.	Les récepteurs-leurres anti-ligands.....	102
c.	Les anticorps anti-AXL.....	103
OBJECTIFS		104
RESULTATS		105
Article 1		106
Article 2		158
Article 3		168
DISCUSSION		174
CONCLUSION		181
BIBLIOGRAPHIE.....		183
ANNEXE.....		208
TABLE DES MATIERES		209
LEXIQUE.....		212

LEXIQUE

Acronym	Gene	Function	URL GeneCards Human Gene Database
<i>ABL</i>	ABL Proto-Oncogene 1	Protein tyrosine kinase involved in a variety of cellular processes, including cell division, adhesion, differentiation, and response to stress	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABL1&keywords=ABL
<i>ANGPT</i>	Angiopoietin	Members of this family play important roles in angiogenesis, binds to an endothelial cell-specific tyrosine-protein kinase receptor	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ANGPT1&keywords=ANGPT
<i>AP1</i>	Jun Proto-Oncogene	Transcription factor that recognizes and binds to the enhancer heptamer motif 5-TGA[CG]TCA-3	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JUN&keywords=AP-1
<i>ARF</i>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A	Stabilizer of the tumor suppressor protein p53 as it can interact with, and sequester, the E3 ubiquitin-protein ligase MDM2	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN2A&keywords=ARF
<i>ASXL1</i>	Additional Sex Combs Like 1	Chromatin-binding protein required for normal determination of segment identity in the developing embryo	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ASXL1&keywords=ASXL1
<i>ASXL2</i>	Additional Sex Combs Like 2	This gene encodes a member of a family of epigenetic regulators that bind various histone-modifying enzymes	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ASXL2&keywords=ASXL2
<i>AXL</i>	AXL Receptor Tyrosine Kinase	The protein encoded by this gene is a member of the Tyro3-Axl-Mer (TAM) receptor tyrosine kinase subfamily	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AXL&keywords=AXL
<i>BAD</i>	BCL2 Associated Agonist Of Cell Death	This protein positively regulates cell apoptosis by forming heterodimers with BCL-xL and BCL-2, and reversing their death repressor activity	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BAD&keywords=BAD
<i>BCL2</i>	BCL2, Apoptosis Regulator	This gene encodes an integral outer mitochondrial membrane protein that blocks the apoptotic death	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL2&keywords=BCL2

<i>BCLXL</i>	BCL2 Like 1	Regulate outer mitochondrial membrane channel (VDAC) opening	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL2L1&keywords=BCLXL
<i>BCOR</i>	BCL6 Corepressor	Interacting corepressor of BCL6, a POZ/zinc finger transcription repressor that is required for germinal center formation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCOR&keywords=BCOR
<i>CBL</i>	Cbl Proto-Oncogene	E3 ubiquitin-protein ligase which accepts ubiquitin from specific E2 ubiquitin-conjugating enzymes promoting their degradation by the proteasome	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CBL&keywords=CBL
<i>CBLB</i>	Cbl Proto-Oncogene B	E3 ubiquitin-protein ligase which accepts ubiquitin from specific E2 ubiquitin-conjugating enzymes promoting their degradation by the proteasome	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CBLB&keywords=CBLB
<i>CCL1</i>	C-C Motif Chemokine Ligand 1	This chemokine, a member of the CC subfamily, is secreted by activated T cells and displays chemotactic activity for monocytes	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCL1&keywords=CCL1
<i>CCL5</i>	C-C Motif Chemokine Ligand 5	Chemokine-chemoattractant for blood monocytes, memory T helper cells and eosinophils	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCL5&keywords=CCL5
<i>CCND1</i>	Cyclin D1	The protein encoded by this gene belongs to the highly conserved cyclin family involved in protein abundance throughout the cell cycle	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCND1&keywords=CCND1
<i>CD11B</i>	Integrin Subunit Alpha M	Integrin alpha-M/beta-2 is implicated in various adhesive interactions of monocytes, macrophages and granulocytes	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ITGAM&keywords=CD11b
<i>CD123</i>	Interleukin 3 Receptor Subunit Alpha	The protein encoded by this gene is an interleukin 3 specific subunit of a heterodimeric cytokine receptor	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL3RA&keywords=CD123
<i>CD14</i>	CD14 Molecule	The protein encoded by this gene is a surface antigen that is preferentially expressed on monocytes/macrophages	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD14&keywords=CD14

<i>CD25</i>	Interleukin 2 Receptor Subunit Alpha	Homodimeric alpha chains (IL2RA) result in low-affinity receptor, while homodimeric beta (IL2RB) chains produce a medium-affinity receptor	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL2RA&keywords=CD25
<i>CD32</i>	Fc Fragment Of IgG Receptor IIa	Member of a family of immunoglobulin Fc receptor genes found on the surface of many immune response cells	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FCGR2A&keywords=CD32
<i>CD34</i>	CD34 Molecule	The protein encoded by this gene may play a role in the attachment of stem cells to the bone marrow extracellular matrix or to stromal cells	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD34&keywords=CD34
<i>CD38</i>	CD38 Molecule	Type II transmembrane glycoprotein that synthesizes and hydrolyzes an intracellular calcium ion mobilizing messenger	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD38&keywords=CD38
<i>CD44</i>	CD44 Molecule	Cell-surface glycoprotein involved in cell-cell interactions, cell adhesion and migration	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD44&keywords=CD44
<i>CD45RA</i>	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type C	Tyrosine phosphatase that acts as a regulator of cytokine receptor signaling	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTPRC&keywords=CD45RA
<i>CD47</i>	CD47 Molecule	Membrane protein, which is involved in the increase in intracellular calcium concentration that occurs upon cell adhesion to extracellular matrix	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD47&keywords=CD47
<i>CD96</i>	CD96 Molecule	Type I membrane protein. The protein may play a role in the adhesive interactions of activated T and NK cells	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD96&keywords=CD96
<i>CDC25A</i>	Cell Division Cycle 25A	CDC25A is a member of the CDC25 family of phosphatases. CDC25A is required for progression from G1 to the S phase of cell cycle	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDC25A&keywords=CDC25A
<i>CDKN1</i>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN1A&keywords=CDKN1

<i>CEBPA</i>	CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha	This gene encodes a transcription factor that contains a basic leucine zipper (bZIP) domain and recognizes the CCAAT motif target	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CEBPB&keywords=CEBPb
<i>CEBPB</i>	CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta	This gene encodes a transcription factor that contains a basic leucine zipper (bZIP) domain and recognizes the CCAAT motif target	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CEBPA&keywords=CEBPA
<i>CHK1</i>	Checkpoint Kinase 1	The protein encoded by this gene belongs to the Ser/Thr protein kinase family. for checkpoint mediated cell cycle arrest in DNA damage	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHK1&keywords=CHK1
<i>CLL-1</i>	C-Type Lectin Domain Family 12 Member A	Members of this family share a common protein fold and have diverse functions, such as cell adhesion, cell-cell signaling, glycoprotein turnover	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CLEC12A&keywords=CLL-1
<i>CPXM1</i>	Carboxypeptidase X, M14 Family Member 1	This gene likely encodes a member of the carboxypeptidase family of proteins	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CPXM1&keywords=CPXM1
<i>CREBB</i>	CREB Binding Protein	Transcriptional coactivation of many different transcription factors	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CREBBP&keywords=CREB
<i>CTLA4</i>	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4	Inhibitory receptor acting as a major negative regulator of T-cell responses	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CTLA4&keywords=ctla4
<i>CXCL12</i>	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12	Ligand for the G-protein coupled receptor, chemokine (C-X-C motif) receptor 4	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL12&keywords=CXCL12
<i>CXCR4</i>	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4	This gene encodes a CXC chemokine receptor specific for stromal cell-derived factor-1	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCR4&keywords=CXCR4
<i>DNMT3A</i>	DNA Methyltransferase 3 Alpha	DNA methyltransferase that is thought to function in de novo methylation, rather than maintenance methylation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DNMT3A&keywords=DNMT3A

<i>EGFR</i>	Epidermal Growth Factor Receptor	EGFR is a cell surface protein that leads to cell proliferation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EGFR&keywords=EGFR
<i>ELK1</i>	ELK1, ETS Transcription Factor	The protein encoded by this gene is a nuclear target for the ras-raf-MAPK signaling cascade	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ELK1&keywords=ELK1
<i>EPO</i>	Erythropoietin	The protein is found in the plasma and regulates red cell production by promoting erythroid differentiation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EPO&keywords=EPO
<i>EPOR</i>	Erythropoietin Receptor	Upon erythropoietin binding, this receptor activates Jak2 tyrosine kinase which activates different intracellular pathways	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EPOR&keywords=EPOR
<i>ETS1</i>	ETS Proto-Oncogene 1, Transcription Factor	Transcription factors that recognizes the core consensus DNA sequence GGAA/T in target genes	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ETS1&keywords=ETS
<i>EZH2</i>	Enhancer Of Zeste 2 Repressive Complex 2 Subunit	Polycomb-group that form protein complexes involved in maintaining transcriptional repressive state of genes over successive generations	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EZH2&keywords=EZH2
<i>FAK</i>	Protein Tyrosine Kinase 2	This gene encodes a cytoplasmic protein tyrosine kinase which is found concentrated in the presence of extracellular matrix constituents	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTK2&keywords=FAK
<i>FAT1</i>	FAT Atypical Cadherin 1	Member of the cadherin superfamily, a group of integral membrane proteins characterized by the presence of cadherin-type repeats	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FAT1&keywords=FAT1
<i>FGF1</i>	Fibroblast Growth Factor 1	FGF family members possess broad mitogenic and cell survival activities, and are involved in a variety of biological processes	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FGF1&keywords=FGF1
<i>FGF2</i>	Fibroblast Growth Factor 2	FGF family members possess broad mitogenic and cell survival activities, and are involved in a variety of biological processes	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FGF2&keywords=FGF2
<i>FLT1</i>	Fms Related Tyrosine Kinase 1	Tyrosine-protein kinase that acts as a cell-surface receptor for VEGFA, VEGFB and PGF+	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FLT1&keywords=FLT1

<i>FLT3</i>	Fms Related Tyrosine Kinase 3	This gene encodes a class III receptor tyrosine kinase that regulates hematopoiesis	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FLT3&keywords=FLT3
<i>FLT3-L</i>	Fms Related Tyrosine Kinase 3 Ligand	Stimulates the proliferation of early hematopoietic cells by activating FLT3. Synergizes well with a number of other CSF and interleukins	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FLT3LG&keywords=FLT3-ligand
<i>FLT4</i>	Fms Related Tyrosine Kinase 4	Tyrosine-protein kinase that acts as a cell-surface receptor for VEGFC and VEGFD, and plays an essential role in adult lymphangiogenesis	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FLT4&keywords=FLT4
<i>FOXO</i>	Forkhead Box	Transcription factor that is the main target of insulin signaling and regulates metabolic homeostasis in response to oxidative stress	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXO1&keywords=FOXOs
<i>FYN</i>	FYN Proto-Oncogene	Non-receptor tyrosine-protein kinase that plays a role in cell growth and survival, cell adhesion, integrin-mediated signaling	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FYN&keywords=FYN
<i>GAB2</i>	GRB2 Associated Binding Protein 2	These proteins contain pleckstrin homology (PH) domain, and bind SHP2 tyrosine phosphatase and GRB2 adapter protein	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GAB2&keywords=Gab2
<i>GAS6</i>	Growth Arrest Specific 6	This gene encodes a gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein thought to be involved in the stimulation of cell proliferation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GAS6&keywords=GAS6
<i>GATA2</i>	GATA Binding Protein 2	Member of the GATA family of zinc-finger transcription factors	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GATA2&keywords=GATA2
<i>G-CSF</i>	Colony Stimulating Factor 3	The protein encoded by this gene is a cytokine that controls the production, differentiation, and function of granulocytes	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CSF3&keywords=G-CSF
<i>GH</i>	Growth Hormone 1	The protein encoded by this gene is a member of the somatotropin/prolactin family of hormones which play an important role in growth control	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GH1&keywords=GH

<i>GM-CSF</i>	Colony Stimulating Factor 2	The protein encoded by this gene is a cytokine that controls the production, differentiation, and function of granulocytes and macrophages	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CSF2&keywords=GM-CSF
<i>GPR56</i>	Adhesion G Protein-Coupled Receptor G1	Binds specifically to transglutaminase 2, a component of tissue and tumor stroma implicated as an inhibitor of tumor progression	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADGRG1&keywords=GPR56
<i>GRB2</i>	Growth Factor Receptor Bound Protein 2	Its two SH3 domains direct complex formation with proline-rich regions of other proteins, and its SH2 domain binds phosphorylated tyrosine	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GRB2&keywords=GRB2
<i>HER2</i>	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2	Bind tightly to other ligand-bound EGF receptor family members to form a heterodimer, stabilizing ligand binding and enhancing kinase-activation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERBB2&keywords=HER2
<i>HIF1A</i>	Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit	HIF-1 functions as a master regulator of cellular and systemic homeostatic response to hypoxia by activating transcription of many genes	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HIF1A&keywords=HIF1a
<i>HOX</i>	Homeobox	Member of the Antp homeobox family and encodes a nuclear protein with a homeobox DNA-binding domain	http://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=HOX
<i>IDH1</i>	Isocitrate Dehydrogenase 1, Cytosolic	Catalyze the oxidative decarboxylation of isocitrate to 2-oxoglutarate	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IDH1&keywords=IDH1
<i>IDH2</i>	Isocitrate Dehydrogenase 2, Mitochondrial	Catalyze the oxidative decarboxylation of isocitrate to 2-oxoglutarate	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IDH2&keywords=IDH1
<i>IFN</i>	Interferon Gamma	This gene encodes a soluble cytokine that is a member of the type II interferon class secreted by cells of both the innate and adaptive systems	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFNG&keywords=IFN
<i>IKK</i>	Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta	Phosphorylates the inhibitor in the inhibitor/NF-kappa-B complex, causing dissociation of the inhibitor and activation of NF-kappa-B	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IKBKB&keywords=IKK
<i>IL-1</i>	Interleukin 1	Cytokine family involved in various immune responses and inflammatory processes	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL1A&keywords=IL-1

<i>IL-2</i>	Interleukin 2	The protein encoded by this gene is a secreted cytokine that is important for the proliferation of T and B lymphocytes	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL2&keywords=IL-2
<i>IL-3</i>	Interleukin 3	This cytokine is capable of supporting the proliferation of a broad range of hematopoietic cell types.	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL3&keywords=IL-3
<i>IL-4</i>	Interleukin 4	Produced by activated T cells, play a role in B cells activation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL4&keywords=IL-4
<i>IL-5</i>	Interleukin 5	This gene encodes a cytokine that acts as a growth and differentiation factor for both B cells and eosinophils	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL5&keywords=IL-5
<i>IL-6</i>	Interleukin 6	This gene encodes a cytokine that functions in inflammation and the maturation of B cells	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL6&keywords=IL-6
<i>IL-7</i>	Interleukin 7	The protein encoded by this gene is a cytokine important for B and T cell development	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL7&keywords=IL-7
<i>IL-8</i>	C-X-C Motif Chemokine Ligand 8	IL-8 is a chemotactic factor that attracts neutrophils, basophils, and T-cells, but not monocytes.	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL8&keywords=IL8
<i>IL-9</i>	Interleukin 9	Cytokine that acts as a regulator of a variety of hematopoietic cells. This cytokine stimulates cell proliferation and prevents apoptosis	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL9&keywords=IL-9
<i>IL-10</i>	Interleukin 10	The protein encoded by this gene is a cytokine produced primarily by monocytes and to a lesser extent by lymphocytes.	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL10&keywords=IL-10
<i>IL-12</i>	Interleukin 12	This gene encodes a subunit of interleukin 12, a cytokine that acts on T and natural killer cells, and has a broad array of biological activities	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL12B&keywords=IL-12

<i>IL-15</i>	Interleukin 15	The protein encoded by this gene is a cytokine that regulates T and natural killer cell activation and proliferation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL15&keywords=IL-15
<i>IL-22</i>	Interleukin 22	Cytokine that contributes to the inflammatory response in vivo	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL22&keywords=IL-22
<i>IL2RA</i>	Interleukin 2 Receptor Subunit Alpha	The interleukin 2 (IL2) receptor alpha (IL2RA) and IL2RB chains, together with the common gamma chain (IL2RG), constitute the high-affinity IL2R	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL2RA&keywords=IL2RA
<i>IL3RA</i>	Interleukin 3 Receptor Subunit Alpha	The receptor is comprised of a ligand specific alpha subunit and a signal transducing beta subunit shared by the receptors for interleukin 3	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL3RA&keywords=IL3RA
<i>JAGGED1</i>	Jagged 1	Ligand for multiple Notch receptors and involved in the mediation of Notch signaling	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JAG1&keywords=NOTCH1
<i>JAK2</i>	Janus Kinase 2	Protein tyrosine kinase involved in a specific subset of cytokine receptor signaling pathways	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JAK2&keywords=JAK2
<i>JUN</i>	AP-1 Transcription Factor Subunit	Interacts directly with specific target DNA sequences to regulate gene expression	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JUN&keywords=JUN
<i>KBRAS1</i>	NFKB Inhibitor Interacting Ras Like 1	Atypical Ras-like protein that acts as a potent regulator of NF-kappa-B activity by preventing the degradation of NF-kappa-B inhibitor	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NKIRAS1&keywords=KBRAS1
<i>KIT</i>	KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase	This protein is a type 3 transmembrane receptor for MGF (mast cell growth factor, also known as stem cell factor)	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KIT&keywords=KIT
<i>LCK</i>	LCK Proto-Oncogene	Non-receptor tyrosine-protein kinase that plays a role in maturation of developing T-cells in the thymus and in the function of mature T-cells.	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LCK&keywords=LCK

<i>LSGAL</i>	Galectines	The galectins are a family of beta-galactoside-binding proteins implicated in modulating cell-cell and cell-matrix interactions	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LGALS1&keywords=galectines
<i>LYN</i>	LYN Proto-Oncogene	Non-receptor tyrosine-protein kinase that plays an important role in the regulation of innate and adaptive immune responses, hematopoiesis	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LYN&keywords=LYN
<i>MCL1</i>	MCL1, BCL2 Family Apoptosis Regulator	This gene encodes an anti-apoptotic protein, which is a member of the Bcl-2 family	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MCL1&keywords=MCL1
<i>M-CSF</i>	Colony Stimulating Factor 1	Cytokine that plays an essential role in the regulation of survival, proliferation and differentiation of hematopoietic precursor cells, especially monocytes	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CSF1&keywords=M-CSF
<i>MDM2</i>	MDM2 Proto-Oncogene	E3 ubiquitin ligase that can promote tumor formation by targeting tumor suppressor proteins, such as p53, for proteasomal degradation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MDM2&keywords=MDM2
<i>MERTK</i>	MER Proto-Oncogene, Tyrosine Kinase	The protein encoded by this gene is a member of the Tyro3-Axl-Mer (TAM) receptor tyrosine kinase subfamily	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MERTK&keywords=mer tk
<i>MET</i>	MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase	Mesenchymal Epithelial Transition MET is a prototypical receptor tyrosine kinase. Its ligand is Hepatocyte Growth Factor (HGF)	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MET&keywords=MET
<i>MLL</i>	Lysine Methyltransferase 2A	This gene encodes a transcriptional coactivator that plays an essential role in regulating gene expression during hematopoiesis	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KMT2A&keywords=MLL
<i>MLL3</i>	Lysine Methyltransferase 2C	This gene is a member of the myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia family and encodes a nuclear protein with a DNA-binding domain	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KMT2C&keywords=MLL3
<i>MPL</i>	MPL Proto-Oncogene	Receptor for thrombopoietin	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MPL&keywords=MPL

<i>MTOR</i>	Mechanistic Target Of Rapamycin	Phosphatidylinositol kinase-related kinases involved in stress such as DNA damage and nutrient deprivation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTOR&keywords=mTOR
<i>MYC</i>	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor	Nuclear phosphoprotein that plays a role in cell cycle progression, apoptosis and cellular transformation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYC&keywords=MYC
<i>MZF1</i>	Myeloid Zinc Finger 1	Binds to target promoter DNA and functions as transcription regulator. Regulates transcription from the PADI1 and CDH2 promoter	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MZF1&keywords=MZF1
<i>NF1</i>	Neurofibromin 1	Negative regulator of the ras signal transduction pathway	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NF1&keywords=NF1
<i>NKG2D</i>	Killer Cell Lectin Like Receptor K1	Function as an activating and costimulatory receptor involved in immunosurveillance upon binding to various cellular stress-inducible ligands	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KLRK1&keywords=NKG2D
<i>NOTCH</i>	<i>NOTCH</i>	Notch signaling is an intercellular signaling pathway that regulates interactions between physically adjacent cells	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOTCH1&keywords=NOTCH
<i>NPM1</i>	Nucleophosmin	This gene encodes a phosphoprotein which moves between the nucleus and the cytoplasm	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPM1&keywords=NPM1
<i>OSM</i>	Oncostatin M	This protein is a secreted cytokine and growth regulator that inhibits the proliferation of a number of tumor cell lines	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=OSM&keywords=oncostatine,M
<i>p300</i>	E1A Binding Protein P300	Histone acetyltransferase that regulates transcription via chromatin remodeling and is important in the processes of cell proliferation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EP300&keywords=p300
<i>PAK1</i>	P21 (RAC1) Activated Kinase 1	Member of serine/threonine p21-activating kinases that serve as targets for the small GTP binding proteins Cdc42 and Rac	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PAK1&keywords=PAK1

<i>PD1</i>	Programmed Cell Death 1	Inhibitory cell surface receptor involved in the regulation of T-cell function during immunity and tolerance	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PDCD1&keywords=PD1
<i>PDK1</i>	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1	One of the major enzymes responsible for the regulation of homeostasis of carbohydrate fuels in mammals	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PDK1&keywords=PDK1
<i>PDL1</i>	Programmed Cell Death 1-ligand	Ligand that binds with the receptor PD1, commonly found on T-cells, and acts to block T-cell activation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD274&keywords=PD1
<i>PHF6</i>	PHD Finger Protein 6	Protein with two PHD-type zinc finger domains, indicating a potential role in transcriptional regulation, that localizes to the nucleolus	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PHF6&keywords=PHF6
<i>PIM</i>	Pim Proto-Oncogene	Contribute to both cell proliferation and survival, and thus provides a selective advantage in tumorigenesis	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PIM1&keywords=PIM
<i>PLCG1</i>	Phospholipase C Gamma 1	Catalyzes the formation of inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol from phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PLCG1&keywords=PLCG1
<i>PML</i>	Promyelocytic Leukemia	This phosphoprotein localizes to nuclear bodies where it functions as a transcription factor and tumor suppressor	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PML&keywords=PML
<i>PRL</i>	Prolactin	This secreted hormone is a growth regulator for many tissues, including cells of the immune system	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PRL&keywords=Prolactin
<i>PROS1</i>	Protein S	This gene encodes a vitamin K-dependent plasma protein that functions as a cofactor for an anticoagulant protease	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PROS1&keywords=PROS1
<i>PTEN</i>	Phosphatase And Tensin Homolog	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTEN&keywords=PTEN

<i>PTPN11</i>	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11	Protein tyrosine phosphatase known to be signaling molecules that regulate cell growth, differentiation, mitotic cycle	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTPN11&keywords=PTPN11
<i>PU.1</i>	Spi-1 Proto-Oncogene	ETS-domain transcription factor that activates gene expression during myeloid and B-lymphoid cell development	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SPI1&keywords=PU-1
<i>RAC1</i>	Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1	GTPase which belongs to the RAS superfamily of small GTP-binding proteins	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RAC1&keywords=RAC1
<i>RAD21</i>	RAD21 Cohesin Complex Component	Gene involved in the repair of DNA double-strand breaks, as well as in chromatid cohesion during mitosis	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RAD21&keywords=RAD21
<i>RARA</i>	Retinoic Acid Receptor Alpha	This receptor regulates transcription in a ligand-dependent manner	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RARA&keywords=RARA
<i>RAS</i>	N-KRAS Proto-Oncogene, GTPase	Intrinsic GTPase activity, is activated by a guanine nucleotide-exchange factor and inactivated by a GTPase activating protein	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NRAS&keywords=RAS
<i>RAS21</i>	RAD21 Cohesin Complex Component	Gene involved in the repair of DNA double-strand breaks, as well as in chromatid cohesion during mitosis	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RAD21&keywords=RAD21
<i>RBPJ</i>	Recombination Binding Protein For Ig K-J Region	This gene encodes an anti-apoptotic protein, which is a member of the Bcl-2 family. Alternative splicing results in multiple transcript variants	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RBPJ&keywords=RBPJ
<i>RET</i>	Ret Proto-Oncogene	This gene, a member of the cadherin superfamily, encodes one of the receptor tyrosine kinases, which are cell-surface molecules	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RET&keywords=RET
<i>RUNX1</i>	Runt Related Transcription Factor 1	Core binding factor (CBF) is a heterodimeric transcription factor that binds to the core element of many enhancers and promoters	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RUNX1&keywords=RUNX1

<i>SCF</i>	KIT Ligand	Plays an essential role in the regulation of cell survival and proliferation, hematopoiesis, stem cell maintenance	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KITLG&keywords=SCF
<i>SF3B1</i>	Splicing Factor 3b Subunit 1	Splicing factor 3b, together with splicing factor 3a and a 12S RNA unit, forms the U2 small nuclear ribonucleoproteins complex (U2 snRNP)	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SF3B1&keywords=SF3B1
<i>SHIP</i>	Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase D	Hydrolyzes the 5-phosphate of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate thereby negatively regulating the PI3K	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=INPP5D&keywords=Ship
<i>SHP2</i>	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11	cf. PTPN11	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTPN11&keywords=PTPN11
<i>SOS1</i>	SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 1	This gene encodes a protein that is a guanine nucleotide exchange factor for RAS proteins	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOS1&keywords=SOS1
<i>SP1</i>	Sp1 Transcription Factor	The protein encoded by this gene is a zinc finger transcription factor that binds to GC-rich motifs of many promoters	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SP1&keywords=SP1
<i>SP3</i>	Sp3 Transcription Factor	The protein encoded by this gene is a zinc finger transcription factor that binds to GC-rich motifs of many promoters	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SP3&keywords=SP3
<i>SRC</i>	SRC Proto-Oncogene	Non-receptor protein tyrosine kinase which is activated following engagement of many different classes of cellular receptors	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SRC&keywords=SRC
<i>SRSF2</i>	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2	Member of the serine/arginine (SR)-rich family of pre-mRNA splicing factors, which constitute part of the spliceosome	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SRSF2&keywords=SRSF2
<i>STAG2</i>	Stromal Antigen 2	The protein encoded by this gene is a subunit of the cohesin complex, which regulates the separation of sister chromatids during cell division	http://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=STAG2

<i>STAT1</i>	Signal Transducer And Activator Of Transcription 1	Signal transducer and transcription activator that mediates cellular responses to interferons, cytokine KITLG/SCF and other cytokines/GF	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STAT1&keywords=STAT1
<i>STAT5</i>	Signal Transducer And Activator Of Transcription 5	STAT family members are phosphorylated by RTK then translocate to the cell nucleus where they act as transcription activators	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STAT5A&keywords=STAT5
<i>SYK</i>	Spleen Associated Tyrosine Kinase	Non-receptor type Tyr protein kinases widely expressed in hematopoietic cells involved in coupling activated immunoreceptors	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SYK&keywords=SYK
<i>TET2</i>	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2	Methylcytosine dioxygenase that catalyzes the conversion of methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TET2&keywords=TET2
<i>TGFB1</i>	Transforming Growth Factor Beta 1	This encoded protein regulates cell proliferation and can modulate interferon gamma and tumor necrosis factor alpha	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TGFB1&keywords=TGFb1
<i>TIAM1</i>	T-Cell Lymphoma Invasion And Metastasis 1	Modulates the activity of RHO-like proteins and connects extracellular signals to cytoskeletal activities	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIAM1&keywords=TIAM1
<i>TIE2</i>	TEK Receptor Tyrosine Kinase	This gene encodes a receptor that belongs to the protein tyrosine kinase Tie2 family	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TEK&keywords=TIE2
<i>TIM3</i>	Hepatitis A Virus Cellular Receptor 2	Cell surface receptor implicated in modulating innate and adaptive immune responses.	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HAVCR2&keywords=TIM3
<i>TNF</i>	Tumor Necrosis Factor	Multifunctional proinflammatory cytokine secreted by macrophages, involved in various biological process including proliferation and apoptosis	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNF&keywords=TNF
<i>TNFRS</i>	TNF Receptor Superfamily Member	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNFRSF1B&keywords=TNFRS

<i>TNFRSF18</i>	TNF Receptor Superfamily Member 18	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNFRSF18&keywords=TNFRSF18
<i>TP53</i>	Tumor Protein P53	This gene encodes a tumor suppressor protein containing transcriptional activation, DNA binding, and oligomerization domains	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53&keywords=TP53
<i>TPO</i>	Thrombopoietin	The main functional protein encoded by this gene is a humoral growth factor that is necessary for megakaryocyte proliferation and maturation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=THPO&keywords=TPO
<i>TSC2</i>	Tuberous Sclerosis 2	Tumor suppressor and is able to stimulate specific GTPases	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TSC2&keywords=TSC2
<i>TUBBY</i>	Tubby Bipartite Transcription Factor	It functions as a membrane-bound transcription regulator that translocates to the nucleus in response to phosphoinositide hydrolysis	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TUB&keywords=TUBBY
<i>TULP1</i>	Tubby Like Protein 1	The protein encoded by this gene is thought to play a role in the physiology of photoreceptors	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TULP1&keywords=TULP1
<i>TWIST</i>	Twist Family BHLH Transcription Factor 1	Basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors have been implicated in cell lineage determination and differentiation	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TWIST1&keywords=TWIST
<i>TYRO3</i>	TYRO3 Protein Tyrosine Kinase	The protein encoded by this gene is a member of the Tyro3-Axl-Mer (TAM) receptor tyrosine kinase subfamily	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TYRO3&keywords=TYRO3
<i>U2AF1</i>	U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1	This gene encode a subunit that plays a critical role in both constitutive and enhancer-dependent RNA splicing	http://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=U2AF1
<i>VEGF</i>	Vascular Endothelial Growth Factor A	This growth factor induces proliferation and migration of vascular endothelial cells, and is essential for angiogenesis	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VEGFA&keywords=VEGF
<i>VEGFR</i>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor	Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a major growth factor for endothelial cells	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KDR&keywords=VEGFR

<i>WNT</i>	Wnt Family Member	Ligand for members of the frizzled family of seven transmembrane receptors	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WNT1&keywords=Wnt
<i>WT1</i>	Wilms Tumor 1	Transcription factor that contains four zinc-finger motifs at the C-terminus and a proline/glutamine-rich DNA-binding domain at the N-terminus.	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WT1&keywords=WT1
<i>YAP</i>	Yes Associated Protein 1	Transcriptional regulator which can act both as a coactivator and a corepressor and is the critical downstream regulatory target	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=YAP1&keywords=YAP
<i>ZRSR2</i>	Zinc Finger RNA Binding Motif And Ser/Arg Rich 2	Associates with the U2 auxiliary factor heterodimer, required for the recognition of a functional 3' splice site in pre-mRNA splicing	http://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=ZRSR2
<i>β-catenin</i>	Catenin Beta 1	Key downstream component of the canonical Wnt signaling pathway	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CTNNB1&keywords=-catenin

