



Leucémie myéloïde chronique : modélisation de l'hématopoïèse leucémique par les cellules souches pluripotentes induites

Gladys Telliam

► To cite this version:

Gladys Telliam. Leucémie myéloïde chronique : modélisation de l'hématopoïèse leucémique par les cellules souches pluripotentes induites. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS273 . tel-01968012

HAL Id: tel-01968012

<https://theses.hal.science/tel-01968012>

Submitted on 2 Jan 2019

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.

NNT : 2016SACLS273



THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
“L'UNIVERSITE PARIS-SUD”

ECOLE DOCTORALE N° 569

Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Immunologie

Par

Mme Gladys Telliam

**LEUCEMIE MYELOIDE CHRONIQUE :
MODELISATION DE L'HEMATOPOIESE LEUCEMIQUE PAR LES CELLULES
SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES**

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 14 décembre 2016 :

Composition du Jury :

Pr M. Pallardy	Professeur et Doyen, Université Paris-Sud	Président
Dr P. Savatier	Directeur de Recherche, INSERM, Bron, Lyon	Rapporteur
Pr P. Coppo	Professeur d'Hématologie, CHU Saint Antoine	Rapporteur
Dr J.C. Chomel	Praticien Hospitalier Hématologie CHU de Poitiers	Examineur
Dr J.H. Bourhis	Praticien Hospitalier Hématologue, Gustave Roussy Villejuif	Examineur
Pr J. Larghero	Professeur, Unité de Thérapie Cellulaire Hôpital Saint-Louis	Examineur
Pr A. Turhan	Professeur d'Hématologie Faculté de Médecine Paris Sud	Directeur de thèse
Pr A. Bennaceur-Griscelli	Professeur d'Hématologie Faculté de Médecine Paris Sud	Co-directrice de thèse

Titre : Leucémie Myéloïde Chronique : Modélisation de l'hématopoïèse leucémique par les cellules souches pluripotentes induites (iPSC)

Mots clés : LMC, hématopoïèse, cellules souches, leucémie, iPSC

Résumé : La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif clonal initié par l'activité tyrosine kinase de l'oncoprotéine de fusion BCR-ABL dans une cellule souche hématopoïétique (CSH) très primitive et caractérisée par une instabilité génétique responsable de l'évolution clonale de la maladie. Les mécanismes de survie, d'autorenouvellement et ceux de la progression vers une phase de leucémie aigüe sont difficilement modélisables dans les CSH primaires de patients. La technologie des iPSC ; permettant de reprogrammer les cellules leucémiques à un état pluripotent ; pourrait permettre de générer *in vitro* des progéniteurs et des cellules leucémiques très primitives, dont l'évolution biologique pourrait être séquentiellement analysée. Dans ce but, nous avons généré une lignée iPSC à partir des cellules leucémiques d'un patient atteint de LMC. Nous avons montré que la lignée iPSC différenciée en hémangioblastes ou en progéniteurs hématopoïétiques présente un potentiel clonogénique accru. Ce potentiel est modulable sous l'action de l'imatinib mesylate ; qui inhibe l'autophosphorylation de BCR-ABL et celle de la protéine CRK-L ; mais également par la manipulation pharmacologique de la voie AHR impliquée dans la quiescence des CSH. En utilisant une stratégie de mutagenèse *in vitro*, nous avons montré la possibilité d'exacerber le potentiel hématopoïétique des cellules hématopoïétiques dérivées des iPSC leucémiques. Les iPSC analysées après traitement par l'agent mutagène ENU présentent des anomalies cytologiques et cytogénétiques additionnelles réminiscentes de la phase blastiques de la maladie. Les analyses moléculaires par aCGH ont permis d'identifier dans les cellules hématopoïétiques dérivées d'iPSC traités par ENU, une signature moléculaire compatible avec celle décrite dans les cellules blastiques de patients. L'ensemble de nos résultats suggèrent qu'il est possible de modéliser certains aspects de la LMC ; notamment un phénotype myéloprolifératif ; et de générer un modèle de progression blastique *in vitro* à partir des iPSC leucémiques, permettant ainsi d'identifier de nouveaux biomarqueurs prédictifs de progression tumorale ou le criblage de médicaments.

Title : Chronic Myeloid Leukemia : Modeling leukemic hematopoiesis using induced pluripotent stem cells (iPSC)

Keywords : CML, hematopoiesis, stem cells, leukemia, iPSC

Abstract: Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative malignancy initiated by tyrosine kinase activity of the fusion oncoprotein BCR-ABL in very primitive hematopoietic stem cell and characterized by a genetic instability leading to clonal progression. Mechanisms of survival, self-renewal and progression of the disease are difficult to model using primary leukemic cells. The use of iPSC technology could allow reprogramming of leukemic cells to pluripotency with generation of primitive leukemic cells whose evolution can be sequentially analyzed. For this purpose, we generated an iPSC cell line from the leukemic cells of a CML patient and analyzed the possibility to generate a myeloproliferative phenotype. We have shown that this iPSC exhibits an increased hematopoietic potential either via EB or Blast-CFC generation. This potential can be modulated by the action of imatinib, inhibiting autophosphorylation of BCR-ABL and that of CRKL. We show that hematopoietic potential of CML iPSC can also be modulated by using AHR antagonists, which allow further amplification of hematopoietic cells. To evaluate the possibility of generating a clonal progression model *in vitro*, we have used a mutagenesis strategy. CML iPSC treated by ENU for several weeks generated hematopoietic cells with increased efficiency. These cells showed evidence of cytological and cytogenetic abnormalities reminiscent of a blast crisis. aCGH analyses of hematopoietic cells generated revealed genomic abnormalities described in CML blast crisis and a molecular signature compatible with blast crisis described in CML patients. These results suggest the feasibility of using patient specific iPSC for modeling CML blast crisis, which could be used for discovery of novel biomarkers and drug screening.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de la direction de l'école doctorale ainsi que les Pr Balabanian et Bennaceur-Griscelli pour leurs soutiens et leurs engagements envers la position de doctorant. Je vous remercie pour votre confiance et vos conseils.

Je remercie également mon directeur Ali Turhan. Merci pour votre confiance, vos encouragements et vos conseils.

A toute l'unité U935,

Je vous remercie tous pour votre aide et nos échanges tout au long de ma thèse mais surtout pour cette ambiance familiale qui règne au sein de notre équipe. Ca a été un vrai plaisir de passer ces quatre années avec vous. Alors un grand merci à Alexandre, Seda, Cécile, Sarah, Lara, Patricia, Dominique, Tony, Eva, Lucie, Olivier, Micheline, Jérôme, Hervé, Adlen...

Enfin et surtout à ma famille...

Merci mamoune pour ton soutien sans faille, ton amour et l'énergie que tu m'as transmis. Merci Audrey, Lindsay, Elodie, Franck, tatie mimi, Rachou pour avoir supporté mon « charabia » scientifique interminable et pour avoir voulu comprendre ce que je faisais. Merci hnnou pour ton soutien et ton oreille toujours attentive.

Merci Ebi pour ton amour, ton soutien et ta présence à mes côtés.

Je suis super fière de faire partie de notre famille. Cette thèse est surtout pour vous.

Le doctorat est un marathon et j'ai franchi la ligne d'arrivée grâce à vous !

Sommaire

Liste des abréviations	1
Introduction	4
Chapitre 1 : La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)	5
1. Généralités	5
2. Historique de la LMC	6
3. Translocation t(9 ;22) et protéine de fusion BCR-ABL	8
a) Chromosome 22q- et la protéine BCR-ABL	8
b) Chromosome dérivatif 9q+ et la protéine ABL-BCR	10
4. Activité kinase de BCR-ABL et domaines conservés	10
a) Le gène ABL normal	10
b) Le gène BCR	12
c) BCR-ABL : activité kinase et potentiel transformant	13
5. Partenaires protéiques et voies de signalisation associées à BCR-ABL	16
6. Rôle de la niche hématopoïétique	20
a) Niche et hématopoïèse : Description	20
b) Niche hématopoïétique au cours de la LMC	22
7. Thérapies	23
a) Historique bref	23
b) Spécificités des iTKs	26
8. Résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinase	27
a) Mécanismes faisant intervenir l'activité de BCR-ABL	27
b) Mécanismes non liés à l'activité de BCR-ABL	28
• ABCB1/P-gp	28
• OCT1/ SLC22A1	29
• IAP, XIAP et Survivine	29
9. Cellules souches leucémiques (CSL) de LMC	31
a) Phénotype des CSL de LMC	31

b) Phénomène de persistance de CSL chez les patients en rémission	31
c) SIRT1	34
d) ARN et microARN	34
e) Microenvironnement	35
10. Physiopathologie de la crise blastique	37
a) Evènements génétiques additionnels	37
b) Défauts de réparation de l'ADN	38
c) Activation d'oncogène au cours de la crise blastique	39
d) Inactivation de gènes suppresseurs de tumeur	39
e) Echappement aux signaux de mort cellulaire	40
11. Modèles d'étude de la LMC	41
a) Lignées cellulaires de LMC	41
b) Modèles murins de LMC	41
c) Modèles de cellules souches embryonnaires de LMC	43
d) Modèles de cellules souches pluripotentes de LMC	43
Chapitre 2 : Cellules souches pluripotentes et mécanismes de reprogrammation	45
1. Contexte historique	45
2. Mécanismes de la reprogrammation	46
a) Facteurs de pluripotence	46
b) Mécanismes de la reprogrammation	47
c) Techniques de reprogrammation : avantages et inconvénients	49
3. Caractéristiques des cellules souches pluripotentes	51
a) Marqueurs caractéristiques	51
b) Potentiel de différenciation	51
4. Perspectives thérapeutiques : modélisation de pathologies	52
Chapitre 3 : Cellules souches pluripotentes et différenciation hématopoïétique	54
1. Hématopoïèse primitive	54
a) Hémangioblaste : sites d'émergence et potentiel	54
b) Différenciation <i>in vitro</i> à partir du modèle ES et IPS	55
c) Phénotype des cellules hémangioblastiques	56

d) Programme transcriptionnel du développement hémangioblastique et de l'hématopoïèse primitive	56
e) Homéostasie de l'hémangioblaste	57
2. Hématopoïèse définitive	58
a) Endothélium hémogénique : sites d'émergence et potentiel	58
b) Phénotype de l'endothélium hémogénique	59
c) Différenciation <i>in vitro</i> à partir du modèle ES et IPS	59
d) Profil transcriptionnel de l'endothélium hémogénique	59
Présentation des travaux	62
Objectifs	63
<u>Article 1:</u> Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with chronic myeloid leukemia (CML) resistant to targeted therapies	65
<u>Article 2:</u> Evidence of hemangioblastic and early hematopoietic potential in chronic myeloid leukemia (CML)-derived induced pluripotent stem cells	70
<u>Article 3 :</u> Generation of a blast crisis model in chronic myeloid leukemia (CML) using patient-specific induced pluripotent stem cells	108
Discussion et perspectives	154
Bibliographie	160

Liste des abréviations

ABL Abelson

ADN Acide désoxyribonucléique

AHR Récepteur Aryl Hydrocarbon

AML Leucémie Aigüe Myeloblastique

Ang1 Angiotensine 1

AR acide rétinoïque

ARN Acide ribonucléique

ARNm Acide ribonucléique messenger

ATM Ataxia Télangiectasia Mutated

ATP Adenosine Tri Phosphate

ATRA acide rétinoïque all Trans

A-MuLV Abelson murine leukemia virus

BCR Breakpoint cluster region

bFGF basic-Fibroblast Growth Factor

BMP Bone Morphogenic Protein

BFU-E Burst Forming Unit- Erythroid

CCyR Réponse Cytologique Complète

CD cluster de différenciation

CFC Colony Forming Cell

CFU-E Colony Forming Unit-Erythroid

CFU-GEMM Colony Forming Unit-Granulo Erythro Macrophage Mégakaryocyte

CFU-G Colony Forming Unit-Granulocyte

CFU-GM Colony Forming Unit-Granulo Monocytic

CHR Réponse Hématologique Complète

CMR Réponse Moléculaire Complète

CSH Cellule Souche Hématopoïétique

CSL Cellule souche leucémique

DH homologue Dbl

EPO Erythropoïétine

ESC cellules souches embryonnaires

ES embryonic stem

EUTOS European Treatment and Outcome Study

FABD Filament Actin Binding Domain

5-FU 5-Fluoro-Uracile

FIV Fecondation *In Vitro*

FLVRES Phénylalanine-Leucine-Valine-Glutamate-Arginine

G-CSF Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GM-CSF Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

GFP Green fluorescent protein

IAP Protéine inhibitrice apoptose

IL Interleukine

iPSC Induced Pluripotent Stem Cells

ITK Inhibiteur Tyrosine Kinase

JAK Janus Kinase

kDa kilo Dalton

KLF4 Kruppel-like factor 4

KO Knock Out

LAL Leucémie Aigüe Lymphoïde

LAM Leucémie Aigüe Myéloïde

Lin Lignage

LMC Leucémie Myéloïde Chronique

LRP Low Density Lipoprotein

LT lymphocyte T

MAPK Mitogen-Activated Protein

MCyR Réponse Cytologique Majeure

MEK MAPK/ERK Kinase

MMR Réponse Moléculaire Majeure

MO Moelle Osseuse

MSC Cellule Souche Mésenchymateuse

NOD-SCID Non Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency

OSKM OCT4, SOX2, KLF4, cMYC

OSLN OCT4, SOX2, LIN28, NANOG

OCT4 Octamer-binding transcription factor 4

PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cell

PCR Polymerase Chain Reaction

PECAM-1 Platelet endothelial cell adhesion molecule 1

PH Homologie Pleckstrin

Ph Philadelphie

PI3K Phosphatidylinositol-3 Kinase

PKB Protéine Kinase B

PTC Patched

PTH Parathyroïd Hormone

ROS Oxygen Reactive Species

SCF Stem Cell Factor

SDF-1 Stromal Cell Derived Factor 1

SH Homologie Src

Shh Sonic Hedgehog

STAT Signal Transducers and Activators of Transcription

STEVE Serine-Thréonine-Glutamine-Valine

TPO Thrombopoïétine

TGF- β Transforming Growth Factor β

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

SOX2 Sex determining region Y box2

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)

1. Généralités

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif représentant 15 à 20% des leucémies chez l'adulte. L'incidence de la maladie est de 1/100000 en France et dans la plupart des pays occidentaux. L'âge médian des patients au diagnostic est de 55 ans avec une incidence légèrement plus élevée chez les hommes (1,3-1,5 :1) (Jabbour and Kantarjian, 2014).

L'histoire naturelle de la maladie comporte trois phases de manière constante, une phase chronique de 3 à 5 ans qui évolue vers une phase dite « accélérée », où la différenciation cellulaire est progressivement altérée, pour aboutir à une phase de leucémie aigüe « phase blastique » de mauvais pronostic, même à l'ère des thérapies ciblées. Cette dernière se caractérise par un arrêt de la différenciation et une accumulation de blastes dans la moelle osseuse et le sang périphérique. Actuellement dans la majorité des cas, le diagnostic est fait de manière fortuite à l'occasion d'un bilan de santé systématique. Dans d'autres cas, la maladie est découverte devant une fatigue ou des douleurs abdominales révélant une splénomégalie. L'étiologie de la maladie est inconnue et les seules conditions qui ont pu être identifiées sont l'exposition aux rayonnements ionisants ; comme par exemple les radiothérapies historiques chez les patients atteints de spondylarthrite ankylosantes ; (Wick et al., 2008) ou de manière plus spectaculaire, la survenue de LMC chez les survivants des bombes atomiques à Nagasaki et Hiroshima en 1945 (Ichimaru, 1991; Lange, 1954). Actuellement, la mortalité liée à la maladie a très fortement diminué depuis l'introduction en clinique des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), cela expliquant l'augmentation de la prévalence liée à la population sous traitement et les nouveaux cas diagnostiqués tous les ans.

Malgré le succès des thérapies, 25 à 30% des patients ne tolèrent pas les ITK en première ligne, ce qui nécessite des changements thérapeutiques. Les greffes de moelle osseuse ne sont plus pratiquées en première ligne et leur utilisation est réservée à des cas de LMC résistants aux thérapies multiples (Jabbour and Kantarjian, 2014; Soverini et al., 2006).

2. Historique de la LMC

La LMC est une affection maligne clonale de la cellule souche hématopoïétique (Fialkow et al., 1967). Elle est connue de longue date, la première description complète datant de 1845 par John Bennett et Rudolph Virchow (Bennett, 1980; Schwalbe, 1901). La figure 1 montre les étapes essentielles des découvertes sur le plan biologique et clinique.

CLINIQUE

1845: Wirchow, Donne, Bennett

Traitements initiaux: Arsenic, irradiation

**1960: Découverte du chromosome Ph1
(Nowell et Hungerford)**

1970: Greffes allogéniques

1983: Efficacité de l' Interferon

1997: IFN ARA-C traitement standard hors greffe

1999: IM

2001-2002 IM traitement de 1ere Ligne

2002: Résistance IM

2004: Inhibiteurs TK 2nd Génération

2006-07: Inhibiteurs anti-mutant 315

RECHERCHE



1967: Origine clonale de la LMC

1970: Abelson MU-LV

1974: Translocation t(9;22)

1984: Clonage du gène de fusion bcr-abl

1986: Activité TK de BCR-ABL

1987: Gène de fusion bcr-abl p190

1990: Modèle murin LMC

1990-99 Signalisation BCR-ABL

2002- Mutations ABL-Kinase

2003-Structure ABL –Interaction TK

2003-CS Ph Résistantes IM

2004-2007 Nouveaux Inhibiteurs TK

Figure 1 : Historique de la LMC

L'élaboration de la technique de coloration des chromosomes au Wright-Giemsa au début des années 70 a permis à Janet Rowley de mettre en évidence sur des échantillons de patients malades, la translocation génétique réciproque entre le chromosome 9 et le chromosome 22. Il s'agissait de la première translocation jamais mise en évidence dans une leucémie humaine.

Cette translocation [t (9 ; 22) (q34 ; q11)] générant le chromosome Philadelphie (le chromosome 22q- = Ph) est responsable de l'initiation de la maladie, tout en sachant que dans certains cas la translocation peut être masquée mais le gène hybride BCR-ABL présent (Rowley, 1973).

Ces travaux font suite à une longue série d'hypothèses sur l'origine et la fonction du chromosome Philadelphie (Ph). Il est découvert initialement en 1960 par Peter Nowell et David Hungerford chez deux patients de sexe masculin atteints de LMC (Nowell and Hungerford, 1960). Il se présentait sous forme d'un « minute chromosome » dans les analyses cytogénétiques de métaphases de cellules de moelle osseuse.

Les hypothèses initiales étaient que ce chromosome de petite taille serait la conséquence d'une délétion du chromosome Y ou serait induit par des endommagements chromosomiques car ces deux patients avaient été traités pour leurs maladies. Baikie et coll. (Baikie, 1960) rapportent la même année la découverte d'un chromosome de petite taille dans les cellules de moelle osseuse de patients atteints de LMC mais n'ayant subi aucun traitement. L'anomalie n'était pas présente dans les fibroblastes de peau, ce qui permit de conclure à un lien probant avec la leucémie. La découverte du chromosome Philadelphie est néanmoins attribuée aux travaux de Nowell et Hungerford à Philadelphie et le chromosome anormal fut nommé Ph1.

Sur le plan physiopathologique enfin, la cellule souche initialement atteinte a été explorée à partir des années 60 avec notamment les travaux pionniers de l'équipe de Fialkow qui, en utilisant les techniques d'inactivation du chromosome X chez les femmes atteintes de LMC, a permis de montrer que la LMC humaine était une maladie monoclonale (Fialkow et al., 1967). Les progrès ont par la suite été extrêmement rapides avec le clonage du gène de fusion BCR-ABL (Witte et al., 1978) ainsi que la découverte du transcrit BCR-ABL p210 dans les cellules leucémiques (Naldini et al., 1986). Ceci permit la mise en place de modèles de LMC par transfert du gène BCR-ABL ainsi que le développement des thérapies ciblées.

3. Translocation t(9 ;22) et protéine de fusion BCR-ABL

a) Chromosome 22q- et la protéine BCR-ABL

Au niveau moléculaire, la translocation induit une jonction entre le proto-oncogène ABL sur le chromosome 9 avec le gène BCR sur le chromosome 22. Le gène hybride BCR-ABL localisé sur le chromosome 22q- est transcrit en un ARNm d'environ 8kb et traduit en une protéine de fusion de 210 kilo Dalton (kDa). Les différents variants du gène hybride dépendent du point de cassure au niveau du gène BCR.

Le gène BCR (Breakpoint Cluster Region) contient une région de 4 à 5 kb riche en points de cassure situés entre les exons 12 et 16 que l'on nomme également exons b1 à b5. Sur le gène ABL, les points de cassures sont répartis sur une région de 200kb (Groffen, 1984).

La translocation du chromosome Ph implique généralement l'intron 1, 13/14 ou l'exon 19 de BCR et une région de 140kb d'ABL entre les exons 1b et 2 (**figure 2**).

La forme majoritaire de 210kDa (p210) est le produit de la recombinaison au niveau des exons 13 ou 14 de BCR avec l'exon 2 d'ABL1. On nomme ces transcrits e13a2, e14a2 (anciennement b2a2 et b3a2 respectivement) ou encore M-BCR pour majeur BCR-ABL1. Cette forme est retrouvée exprimé dans 95% des cas de LMC Ph+, dans 5% des leucémies aigüe myéloïde (LAM), 15 à 30% des leucémies lymphoïdes adultes (LAL) et 5% des LAL chez l'enfant.

Le produit de la cassure entre l'intron 1 de BCR et l'exon 2 d'ABL1 est une protéine de 190kDa (p190) dit transcrit mineur m-BCR ou e1a2. Cette forme est présente dans environ 25% des LAL-B de l'adulte et plus rarement dans les LAM. Elle peut également être présente dans les cellules leucémiques de patients atteints de LMC, cela étant probablement suite à un épissage alternatif. Les crises blastiques lymphoïdes faisant suite à une phase chronique de LMC, les cellules blastiques expriment simultanément BCR-ABL p210.

Il existe une troisième forme de la protéine BCR-ABL de 230kDa désignée par le terme de « microtranscrit » BCR (μ -BCR), produit de la cassure entre les exons 19 de BCR (BCR complet) et l'exon 2 d'ABL1. Cette forme est considérée comme un marqueur moléculaire de la LMC à polynucléaires neutrophiles dont l'évolution et la réponse au traitement sont identiques aux cas de LMC p210 (Pasternak et al., 1998). Certains cas de LMC peuvent exprimer des formes de cassures plus rares : e6a2, e8a2, e18a2 ou encore e14a2 (Sorel et al., 2010; Weerkamp et al., 2009).

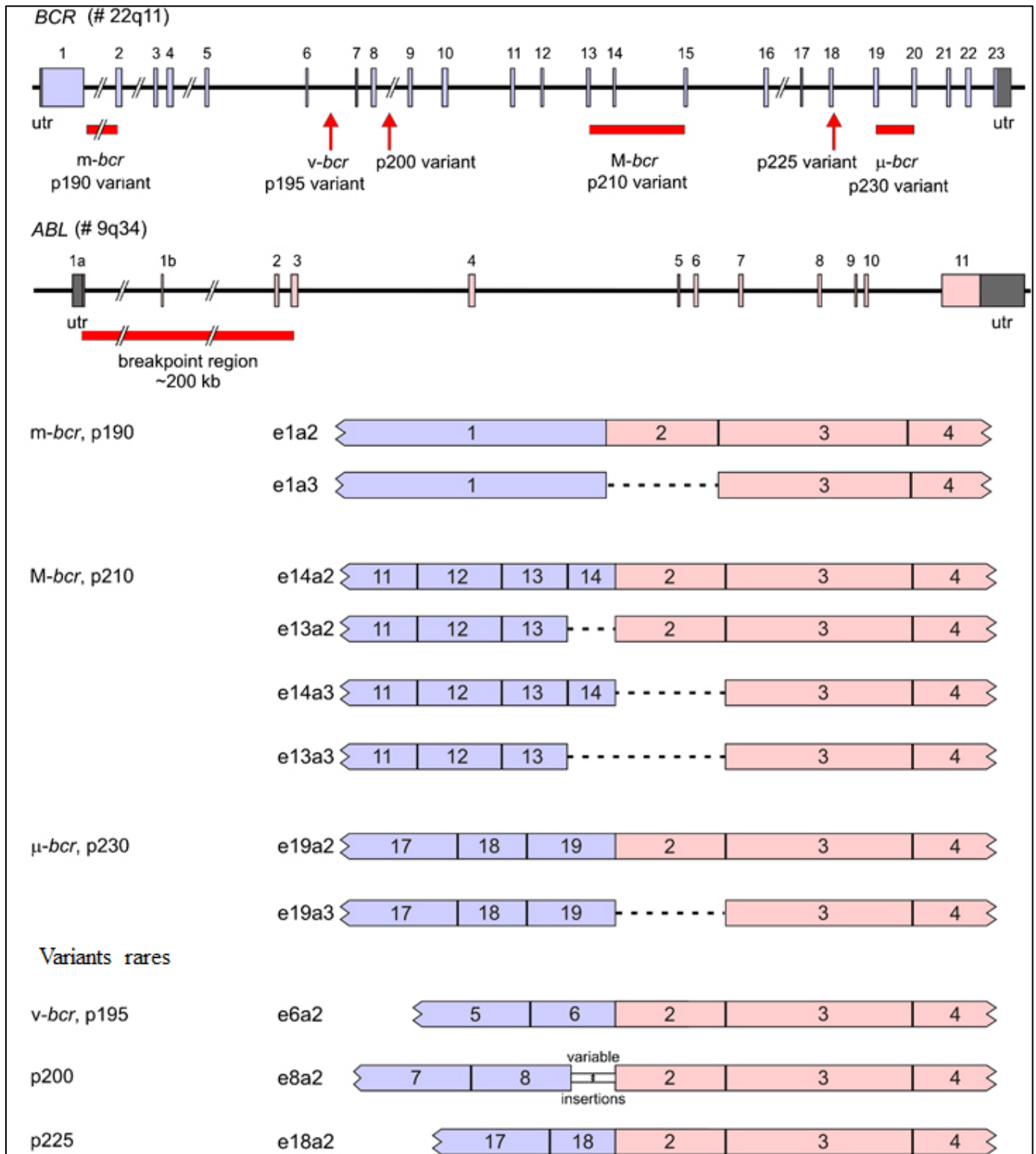


Figure 2 : Structure moléculaire des gènes BCR et ABL avec leurs différents points de cassures et les transcrits de fusion correspondant (d'après (Weerkamp et al., 2009)).

b) Chromosome dérivative 9q+ et la protéine ABL-BCR

Le produit réciproque de la translocation ABL-BCR localisé sur le chromosome 9q+ est également transcrit dans 70% des cas de LMC (Melo et al., 1993). Il produit quatre transcrits d'épissage alternatif : ABL (1a ou 1b)-b3 et ABL (1a ou 1b)-b4. Les formes b3 et b4 associées à l'exon 1b d'ABL sont plus longues et sont transcrites dans 2/3 des cas de LMC Ph+. 82% des patients ont uniquement les transcrits 1b et 18% expriment les deux simultanément. Les protéines traduites possèdent de 370 à 414 acides aminés et contiennent la région GAP de BCR. La délétion du chromosome dérivative 9q+ peut être présente chez les patients atteints de LMC dès le diagnostic (Grand et al., 1999; Herens et al., 2000; Huntly et al., 2001) mais également lors des crises blastiques lymphoïdes ou myéloïdes (Wafa et al., 2015). La délétion de certains gènes dans cette région du génome pourrait avoir un effet délétère comme cela a été suggéré pour le complexe Swi /Snf (Grand et al., 1999). De même, la perte du transcrit ABL-BCR dans les cellules leucémiques pourrait affecter la croissance cellulaire même si le rôle précis de ce transcrit reste à ce jour indéterminé. Le rôle potentiellement péjoratif de cette délétion est sujet à controverse depuis plusieurs années ; à la fois réfuté lors de travaux successifs effectués sur une importante cohorte de patients au diagnostic mais également appuyé lors d'études effectuées sur des crises blastiques (Huntly et al., 2002; Reid et al., 2002).

4. Activité kinase de BCR-ABL et domaines conservés

a) Le gène ABL normal

Le gène ABL est l'homologue humain du gène transformant murin v-Abelson (A-MuLV : Abelson murine leukemia virus) (Abelson and Rabstein, 1970; Shields, 1979). A-MuLV est un rétrovirus non répliquatif capable d'induire une transformation rapide dans les cellules lymphoïdes B et les fibroblastes *in vitro* (Shields et al., 1979; Witte et al., 1978).

Le proto-oncogène ABL (c-abl) code une protéine ubiquitaire de 145kDa initialement localisée dans le noyau. Il existe deux transcrits variants possédant un motif de cinq lysines au niveau du dernier exon correspondant à un signal de localisation nucléaire.

L'isoforme dérivée du variant d'épissage 1b (plus long) possède également un domaine NH2-terminal glycine pouvant être myristylé et potentiellement dirigé à la membrane plasmique (Van Etten et al., 1989). Les deux isoformes 1a et 1b ont des niveaux d'expression équivalents dans les différents tissus. La protéine ABL est constituée de différents domaines conservés : plusieurs domaines de liaison à l'ADN, un domaine de liaison aux filaments d'actine FABD (F-actin binding domain), un signal d'import et d'export nucléaire ainsi que 3 domaines Src-homologie (SH). Le domaine Src-homologie de type 1 constitue le domaine tyrosine kinase de c-abl avec un site de fixation à l'ATP et un site catalytique, le domaine SH2 contient un motif FLVRES qui permet la liaison des phosphotyrosines et le domaine SH3 est responsable de la localisation nucléaire permettant de contrôler la fonction de la protéine (Sawyers, 1994) (**figure 3**). La fixation de protéines sur le site de myristylation d'ABL en NH2-terminal entraîne l'auto-inhibition de son activité tyrosine kinase.

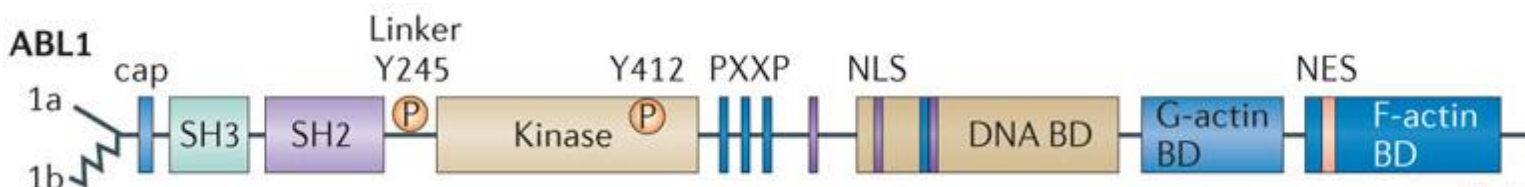


Figure 3 : Structure de la protéine ABL (d'après (Greuber et al., 2013)).

ABL est une protéine importante du métabolisme cellulaire. En effet, les souris c-abl déficientes présentent un développement fœtal normal mais un retard de croissance et une mort précoce quelques semaines après la naissance (Schwartzberg, 1991; Tybulewicz, 1991). ABL agit comme un gène suppresseur de tumeur. Localisée dans le noyau, elle présente une faible activité tyrosine kinase (Pendergast et al., 1991). Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires mais contrôle principalement la progression cycle cellulaire.

La surexpression de l'isoforme 1b après transfection rétroviral dans la lignée de fibroblastes NIH3T3 induit une augmentation de l'activité kinase 5 à 10 fois supérieur au niveau endogène et un arrêt de la croissance cellulaire avec 90% de cellules bloquées en phase G1. Les domaines protéiques « Src-homology » pourraient médier l'effet antiprolifératif de c-abl comme le montre la surexpression des différents mutants SH1 (K290R), SH2 (R171L) ou SH3 (dominant négatif). Ces mutants induisent une relocalisation cytoplasmique de la protéine, une augmentation de l'activité kinase et une augmentation de la prolifération avec 23% des cellules en phases S ou G2/M (Sawyers, 1994).

b) Le gène BCR

Le gène BCR (Breakpoint Cluster Region) code une protéine cytoplasmique ubiquitaire avec une expression prédominante au niveau du cerveau et des tissus hématopoïétiques. Il existe trois isoformes de 130 kDa, 190 kDa et une forme majoritaire de 160 kDa (Turhan, 2011). BCR est une protéine à domaines multiples avec différentes fonctions enzymatiques. Elle comprend un domaine d'oligomérisation en NH2-terminal (coiled coil) nécessaire à son potentiel transformant, une activité Ser/Thr kinase avec au moins 3 domaines SH2 comprenant 4 sites de phosphorylation sur des tyrosines (Y177, Y283, Y328, Y360) (Maru, 1991; Ress and Moelling, 2005), un domaine GEF (facteur d'échange des guanines) appelé Dbl-homologous (DH) possiblement impliqué dans des signaux de réparation d'ADN, un domaine d'homologie pleckstrin (PH), une activité GAP (GTPase activating protein) agissant sur les protéines p21Rac, Cdc42 et Rho (Diekmann, 1991) et enfin une séquence STEV en COOH-terminal qui constitue un ligand pour des protéines à domaine PDZ permettant l'ancrage de certaines composantes du cytosquelette (Radziwill et al., 2003) (**figure 4**).

BCR

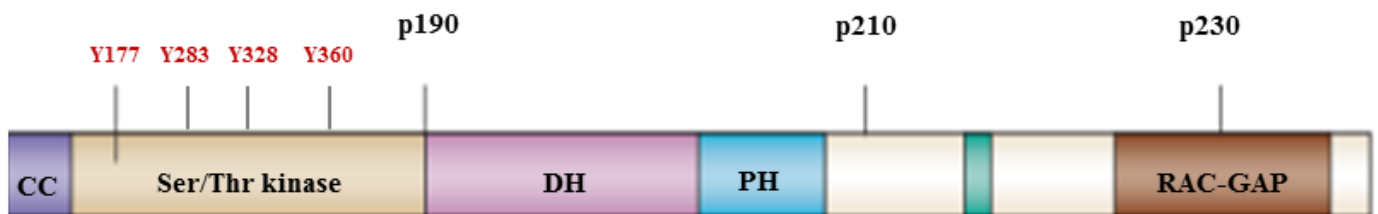


Figure 4 : Structure de la protéine BCR

BCR exerce deux fonctions majeures : une fonction d'immunomodulation et une fonction indirecte de régulateur négatif du cycle cellulaire. *In vivo* il intervient dans la régulation du « burst oxydatif » des neutrophiles, qui produisent par ce mécanisme des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Il exerce par ailleurs une modulation négative dose-dépendante sur l'activité kinase de BCR-ABL et, complexé avec la bêta-caténine, régule négativement l'expression de c-myc (Lin et al., 2001; Mahon et al., 2003). En effet, dans la lignée humaine de carcinome du colon HCT116 surexprimant c-myc, la surexpression de BCR induit une forte diminution de son expression via la voie Wnt/bêta-caténine (Ress and Moelling, 2005). Il peut également s'associer directement avec c-myc et induire sa dégradation (Mahon et al., 2003). BCR régule négativement la voie MAP kinase via la phosphorylation de la protéine AF-6, partenaire protéique de Ras.

Enfin, il a été montré que dans le tissu cérébral, sa délétion conduisait à une hyperactivité des astroglies (Oh et al., 2010).

c) BCR-ABL : activité kinase et potentiel transformant

Le gène de fusion BCR-ABL transcrit en un ARN anormal, code pour une protéine tyrosine kinase de 210 kDa, avec une activité dérégulée responsable d'une prolifération incontrôlée des progéniteurs et des cellules myéloïdes matures du système hématopoïétique, principalement de la lignée granulocytaire (**figure 5**). En premier lieu cette prolifération s'opère sans blocage de la différenciation puis se traduit par une accumulation de progéniteurs indifférenciés dans la moelle osseuse, le sang et la rate.

La protéine de fusion BCR-ABL entraîne un gain de fonction qui affecte la protéine ABL. Alors que la protéine ABL normale a un rôle de régulation négative du cycle cellulaire et est essentiellement nucléaire, la copie impliquée dans la fusion BCR-ABL est oncogénique et cytoplasmique. BCR-ABL conserve les domaines Ser/Thr kinase, RhoGEF et le domaine coiled coil de BCR ainsi que les domaines SH, les domaines de liaison à l'ADN, FABD, les domaines d'import et d'export nucléaire d'ABL. La fusion entraîne la perte de la séquence codant le site de myristylation, ce qui entraîne la perte du rétrocontrôle de l'activité tyrosine kinase.

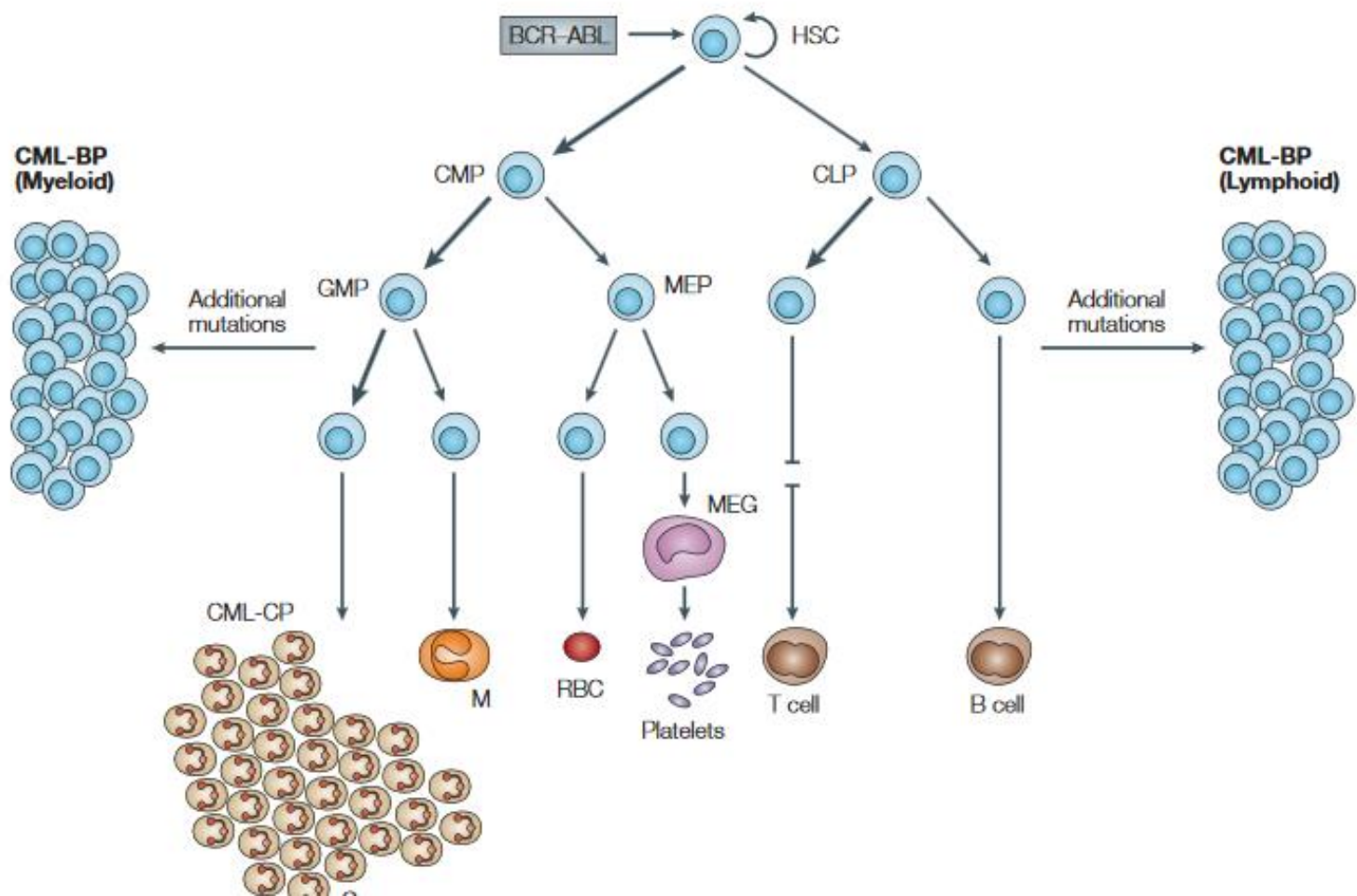


Figure 5 : Modèle de développement de la leucémie myéloïde chronique (d'après (Ren, 2005))

L'activation constitutive de BCR-ABL s'opère par la juxtaposition de BCR, cela permet la dimérisation ou la tétramérisation de la protéine aboutissant à son autophosphorylation. Les différents sites de phosphorylation de BCR-ABL permettent le recrutement de nombreux partenaires protéiques qui vont induire différentes voies de signalisations. Ces voies vont avoir un impact sur le cycle cellulaire, la migration, l'apoptose, la réponse aux signaux de l'environnement cellulaire ou encore la réponse aux dommages causés sur l'ADN (développé partie 5) (**figure 6**).

L'homologue de BCR-ABL chez la souris est l'oncoprotéine v-Abl. Elle a une activité kinase hautement active qui induit une leucémie aigüe lymphoïde pré-B chez la souris (Rosenberg, 1989). De nombreux travaux ont démontré le potentiel transformant de la protéine de fusion BCR-ABL *in vivo* dans différents modèles murins et *in vitro* dans des fibroblastes de rat (Shields et al., 1979; Van Etten et al., 1989).

La LMC est certainement la leucémie la mieux connue et la plus « modélisée » au monde. Plusieurs types de modèles expérimentaux ont pu être utilisés, depuis les lignées de type K562 jusqu'aux modèles murins syngéniques ou xénogéniques. Dans des modèles expérimentaux devenus actuellement classiques, la moelle osseuse de souris (BALB-c, DBA/2 ou C57BL/6), enrichie en cellules souches après injection de 5-FU (5 fluorouracil), est transduite avec un rétrovirus déficient comportant le cDNA p210 de BCR-ABL. Les cellules transduites de cette manière sont transplantées à des souris syngéniques léthalement irradiées. 4 à 6 semaines après la greffe, toutes les souris développent un syndrome myéloprolifératif avec des analogies phénotypiques de la phase chronique de la LMC observée chez l'homme. On observe une hyperleucocytose majeure avec une prolifération monocyttaire et granulocytaire dans le sang associée à une splénomégalie. Cependant, les modèles initiaux développés ne permettaient pas de reproduire la maladie telle qu'on l'observe chez l'homme. En effet suivant le type de vecteur et de promoteurs, les souris développaient des tumeurs macrophagiques et des lymphomes (Daley, 1990; Elefanty et al., 1990; Kelliher et al., 1990; Lugo, 1990). Il a fallu attendre le développement de vecteurs BCR-ABL inductibles pour reproduire un syndrome myéloprolifératif proche de la maladie humaine.

Il existe une différence fonctionnelle entre les isoformes de BCR-ABL. La p190 a un potentiel oncogénique plus important que la forme p210. Comme cela a pu être observé dans des fibroblastes de rats transduits avec l'une des deux formes. Ce potentiel transformant de la p190 est dû à une activité kinase plus importante (Lugo, 1990). La p190 possédant une portion plus petite du gène BCR, les domaines de la partie BCR pourraient jouer un rôle sur la sévérité et la progression de la maladie.

5. Partenaires protéiques et signalisation associées à BCR-ABL

BCR-ABL contient un grand nombre de domaines (Ser/Thr kinase, Tyr kinase, FABD...) qui permettent l'induction de voies de signalisation en se liant à des protéines adaptatrices à domaines SH2 et/ou SH3 comme GRB2 et CRKL. CRKL est un substrat majeur de BCR-ABL. Il est constitutivement activé et sert de référence pour évaluer l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL. La cascade de signalisation qu'il induit inclut CBL, STAT5/3, PI3K, PAXILLIN et RAS. D'autres protéines comme p62-DOK, CBL, VAV, RIN1, FAK, JAK2, sont également des substrats de BCR-ABL. Ces substrats phosphorylés en résidus Tyr activent à leur tour les molécules effectrices en aval. L'expression de BCR-ABL dans la cellule souche hématopoïétique entraîne donc l'activation de nombreuses voies de signalisation impliquées dans différents processus cellulaires : prolifération, survie, adhésion, résistance à l'apoptose et surtout instabilité génétique (Ahmed and Van Etten, 2013; Mughal et al., 2016)(**figure 6**).

La voie de signalisation PI3K/AKT peut être activée par les complexes BCR-ABL/GRB2/GAB2/CBL, BCR-ABL/SFK ou encore BCR-ABL/CRKL. Elle conduit généralement à une réponse cellulaire anti-apoptotique mais peut également réguler la prolifération, la différenciation et la transformation des cellules leucémiques. La protéine kinase B (PKB) AKT cible des facteurs de transcriptions, comme FOXO, NFκB ou CREB, des protéines telles que BAD, p27, GSK3β, IKK, MDM2 ou la Cycline D à travers la voie mTOR/FRAP. En effet, la Ser/Thr kinase mTORC1 en aval de la voie PI3K/AKT/FOXO4 contrôle le passage du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S via la cycline D. Outre son rôle sur la croissance des cellules, la voie mTOR agit sur la synthèse protéique, la taille des cellules et l'autophagie. Les signaux de la voie PI3K sont souvent antagonisés par le suppresseur de tumeur PTEN (phosphatase and tensin homolog). Sa délétion entraîne l'augmentation du niveau de phosphorylation de STAT5 et AKT. BCR-ABL down-régule PTEN *in vivo* et sa surexpression induit l'arrêt du cycle cellulaire des cellules leucémiques (**figure 7**).

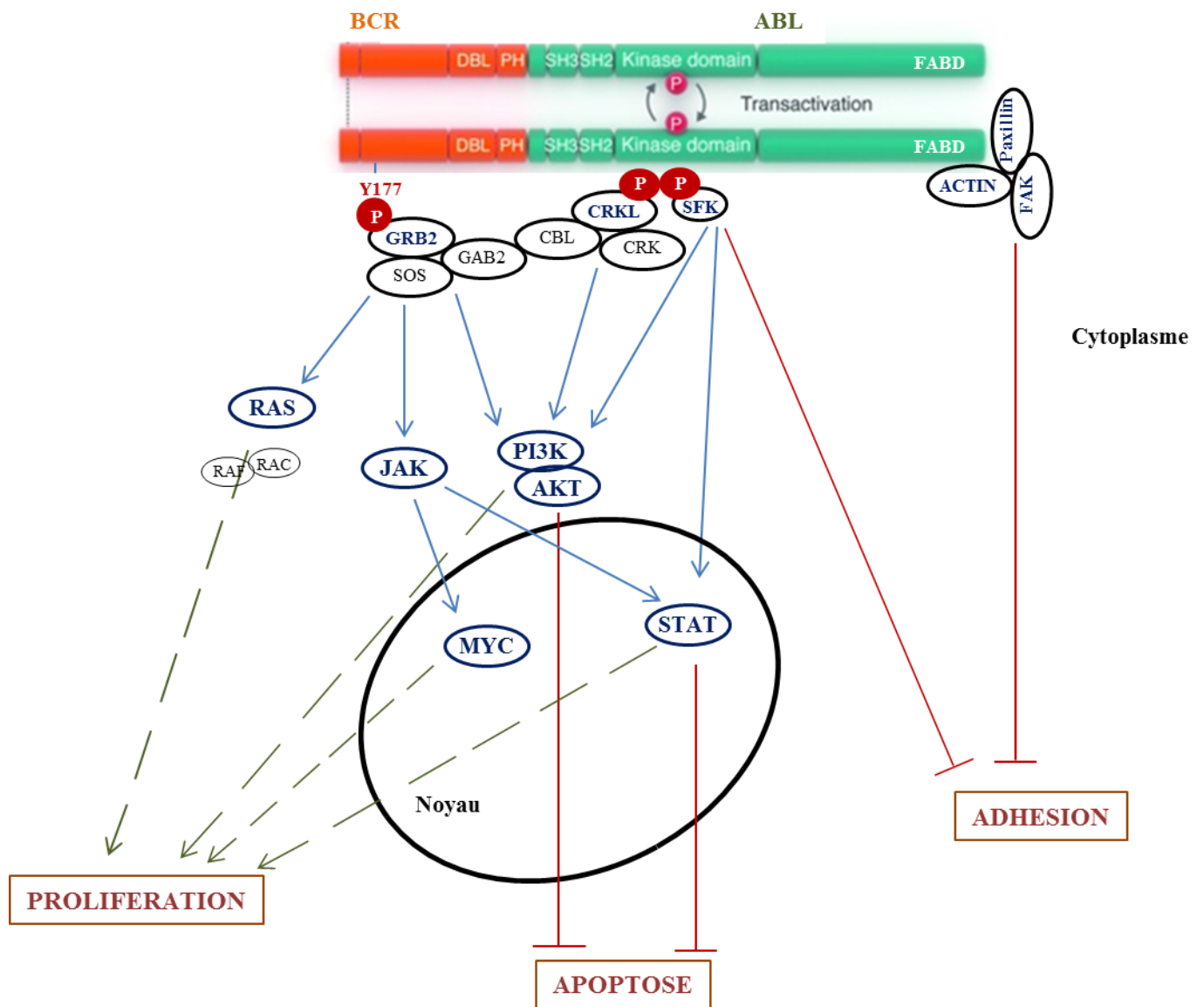


Figure 6 : Aspect général de la signalisation induite par BCR-ABL. Les flèches bleues et vertes : Signaux d'activation ; lignes rouges signaux inhibiteurs.

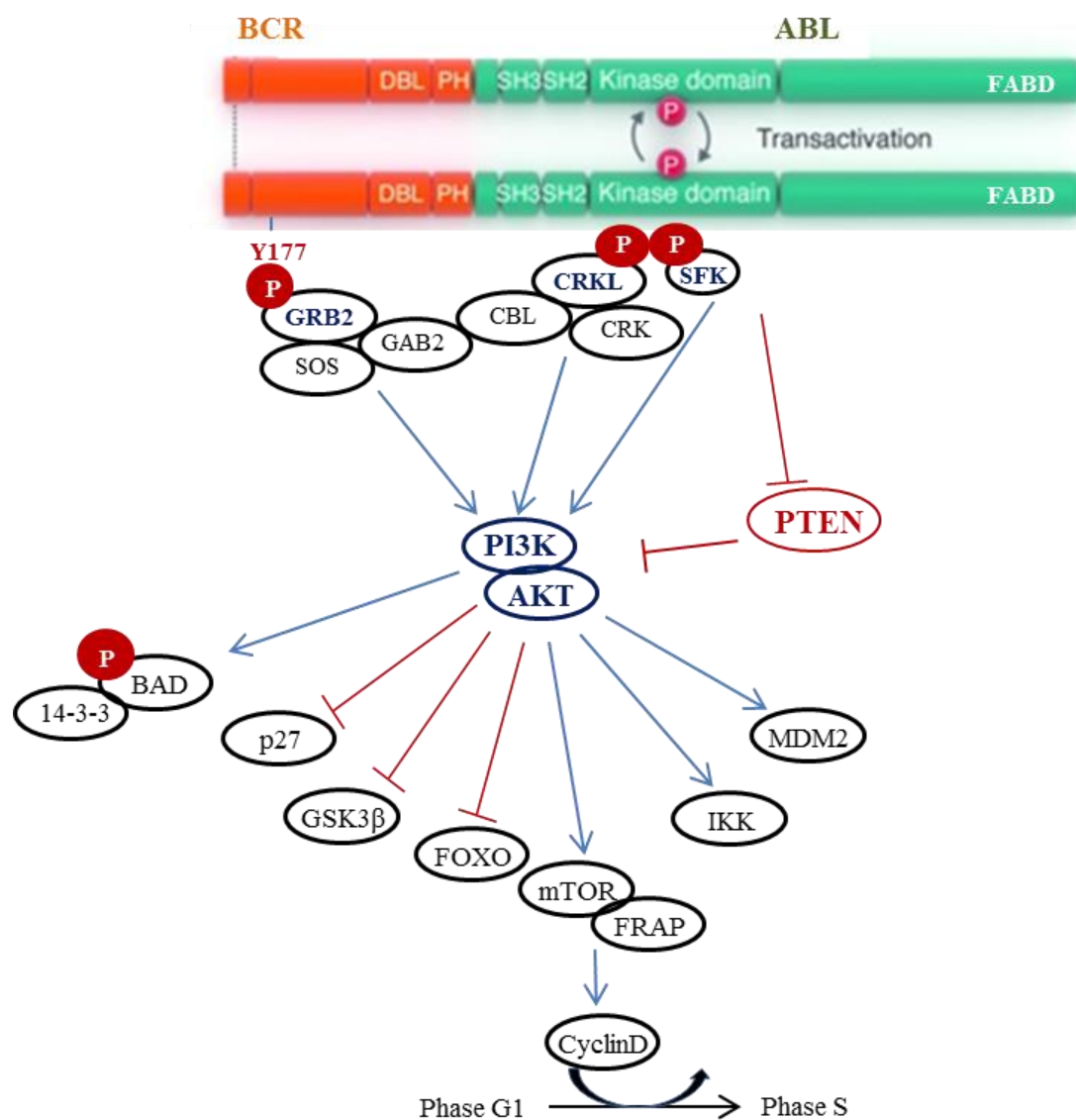


Figure 7 : Voie de signalisation PI3K/AKT dans la cellule leucémique. Les flèches bleues : Signaux d'activation ; lignes rouges : signaux inhibiteurs.

Les kinases Src comme Hck, Lyn et Fyn sont fortement activées par BCR-ABL et la cascade de signalisation qu'elles induisent implique également STAT5 et AKT. Elles coordonnent ainsi la croissance cellulaire, la différenciation et la mobilité des cellules tumorales. Dans les cellules qui expriment BCR-ABL, STAT5 est phosphorylé et majoritairement retenu dans le cytoplasme. L'inactivation de STAT5 chez la souris démontre son importance dans le développement et le maintien de la LMC murine. En effet, chez les souris déficientes en $STAT5A^{-/-}$ (KO), l'induction d'un phénotype de LMC après transduction par un vecteur exprimant BCR-ABL devient très inefficace (Ye, 2006). L'activation de STAT5 semble donc essentielle pour l'induction d'un phénotype myéloïde mais pas lymphoïde car ces souris développent des LAL-B. Sur le plan moléculaire, STAT5 est directement phosphorylé par BCR-ABL pour être transloqué dans le noyau après sa dimérisation afin de promouvoir la survie et la croissance des cellules. Par la Tyr177, BCR-ABL active directement JAK2 et inversement, afin de stimuler son activité kinase (Samanta et al., 2011). L'implication de JAK2 dans le déclenchement de la LMC est un sujet de controverse, d'où l'hypothèse de l'activation directe de STAT5 par BCR-ABL (Hantschel et al., 2012; Xie et al., 2001)(figure 8).

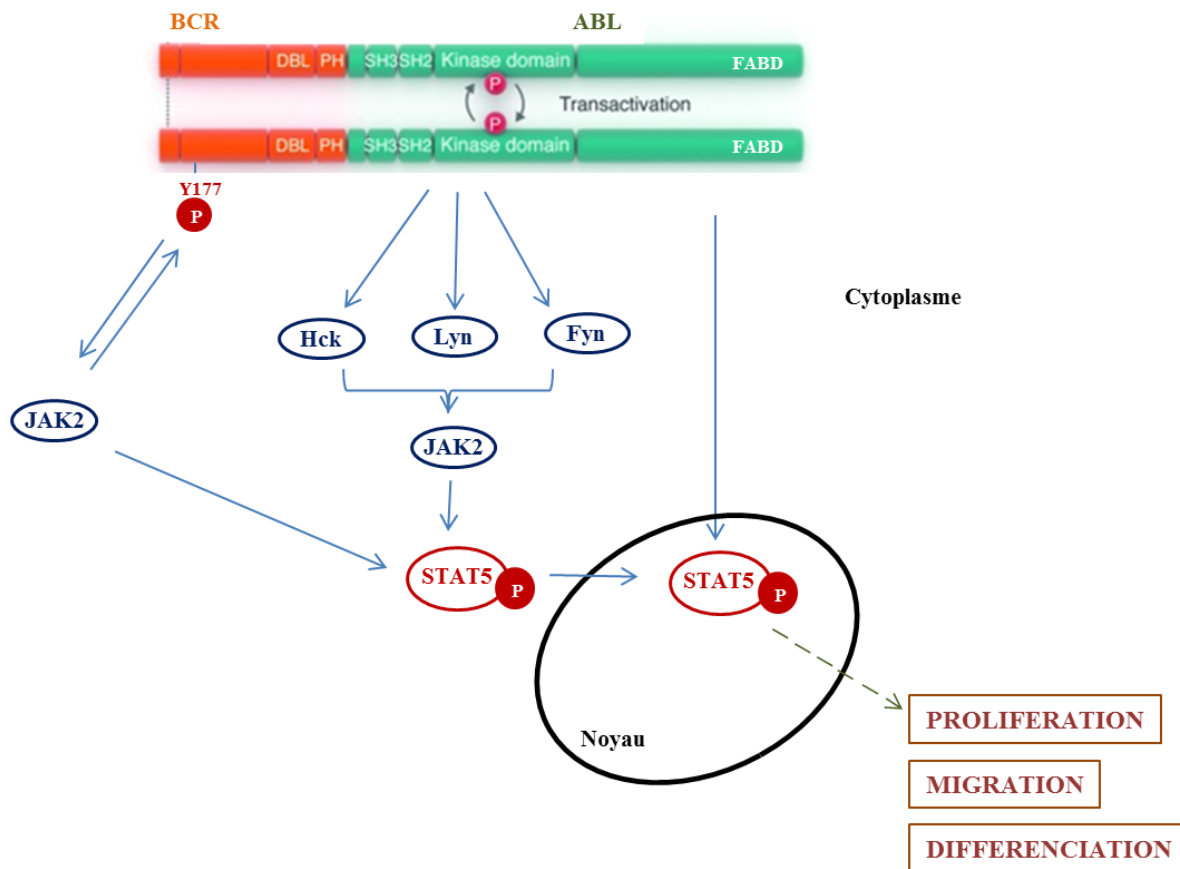


Figure 8 : Voie de signalisation JAK/STAT dans la cellule leucémique. Les flèches représentent les états d'activation.

BCR-ABL phosphorylé en Tyr705 active STAT3 en Ser727 de manière dose dépendante dans les lignées LMC et les cellules primaires de patients (Coppo et al., 2003). Cette activation passe par JAK et MEK car la phosphorylation en Ser727 est associée à la phosphorylation constitutive de JAK1 ou JAK2 et l'inhibition de MEK qui bloque ainsi la phosphorylation de STAT3 *in vitro*. La voie RAS/MAP kinase est également une voie majeure pour la prolifération et la survie des cellules BCR-ABL. La GTPase RAS est activée de manière constitutive par le complexe GRB2/GAB2/SOS et induit entre autre l'expression du facteur de transcription NFκB (Reuther et al., 1998).

BCR-ABL, qui est cytoplasmique, va lier l'actine via son domaine FABD. Cette interaction induit la phosphorylation d'autres protéines du cytosquelette comme FAK et PAXILLINE conduisant à une adhésion aberrante qui pourrait contribuer, entre autres anomalies, à la circulation des progéniteurs et des précurseurs myéloïdes dans le sang périphérique (Cheng et al., 2002)(**figure 6**).

6. Rôle de la niche hématopoïétique

a) Niche et hématopoïèse : description

La niche hématopoïétique est un concept initialement formulé par les travaux de Schofield (Schofield, 1978). En effet Schofield avait noté que les cellules souches murines CFU-S générées au contact de l'os médullaire avaient un potentiel d'autorenouvellement accru par rapport aux CFU-S provenant de la rate. Les expériences chez la souris ont par la suite permis de mettre en évidence deux types de « niche » : les « niches » médullaires vasculaires et ostéoblastiques.

Dans les situations physiologiques normales, les contacts des cellules hématopoïétiques (souches, précurseurs ou progéniteurs) avec le stroma médullaire permettent le maintien des fonctions des cellules souches, qui reçoivent ainsi des signaux de survie, de prolifération, de différenciation et de quiescence. Au cours des dernières années, les bases moléculaires de ces fonctions ont été progressivement élucidées dans les CSH normales mais aussi leucémiques.

Les cellules stromales de la moelle osseuse induisent des voies de signalisation (Hedgehog, Wnt, Notch), sécrètent des cytokines (TPO, Ang1, TGF-β) et des chimiokines, expriment des molécules d'adhésion, des molécules de la matrice extracellulaire et sont à l'origine de la régulation normale et pathologique des cellules hématopoïétiques (**figure 9**).

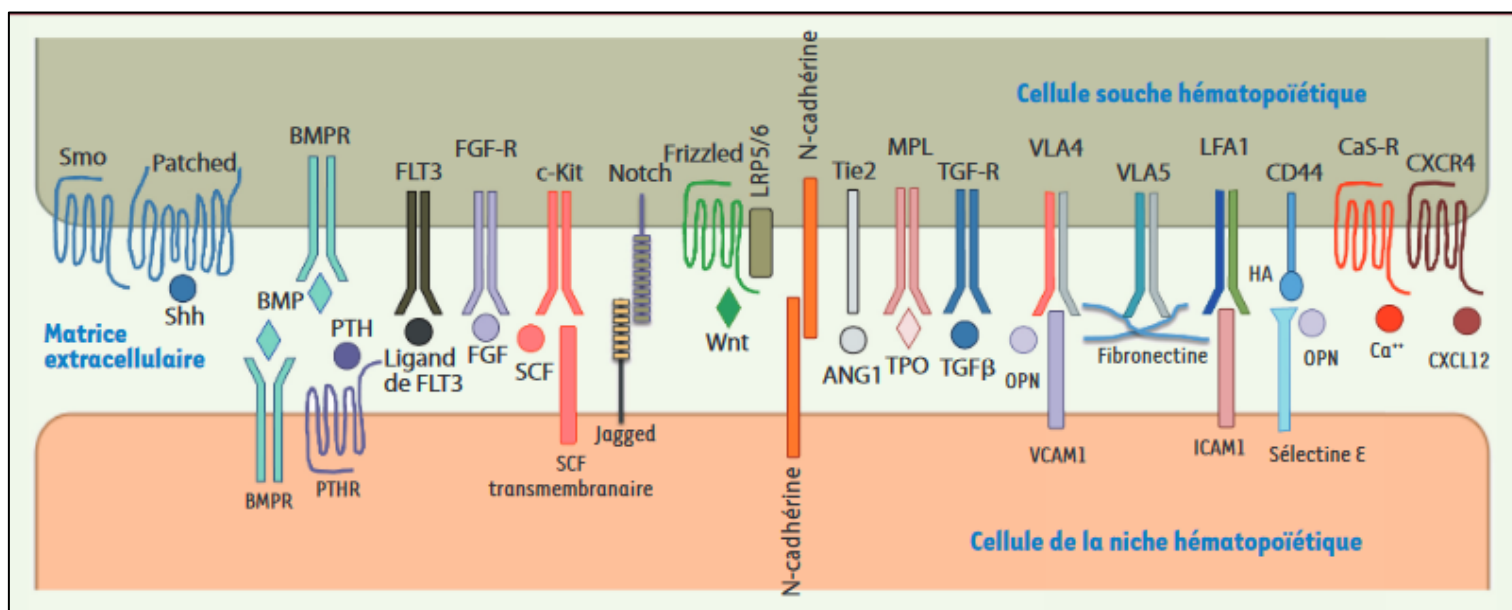


Figure 9: Représentation des interactions entre la niche et les CSH (d'après (Chomel et al., 2014)).

La « niche » médullaire est un tissu complexe fait de cellules stromales, endothéliales, ostéoblastiques ou adipocytaires. Elles sont richement innervées par des cellules de Schwann non myélinisées et coopèrent avec des cellules hématopoïétiques matures de types monocytes, macrophages et mégacaryocytes.

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont attirées vers la « niche » par la chimiokine CXCL12 ou SDF-1 via leurs récepteurs CXCR4. Cette chimiokine est produite par les CAR et dans une moindre proportion par les ostéoblastes. La rétention des CSH au niveau de la niche a lieu via l'action des sélectines, des molécules d'adhérences comme le CD44, ICAM1 ou VCAM1, des intégrines LFA1, VLA4/5 (respectivement $\alpha\text{L}\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$) ainsi que des composantes de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou l'acide hyaluronique.

La caractéristique principale des cellules souches est leurs capacités à s'autorenouveler. L'autorenouvellement n'est possible qu'en présence de divisions symétriques ou asymétriques, qui assurent le caractère « souche » d'une cellule fille (**figure 10**). Plusieurs récepteurs et ligands impliqués dans l'autorenouvellement des CSH normales sont connus, tels que le FLT3, FGF-R, c-KIT, Notch et les ligands Jagged. On connaît de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la quiescence des CSH. Parmi elles, la voie Wnt jouerait également un rôle dans le mécanisme de l'autorenouvellement et dans l'induction de la quiescence des CSH. Le nombre de CSH et la taille de la niche sont contrôlés par les protéines de la famille BMP, TGF- β et la parathormone (PTH) (Chomel et al., 2014).

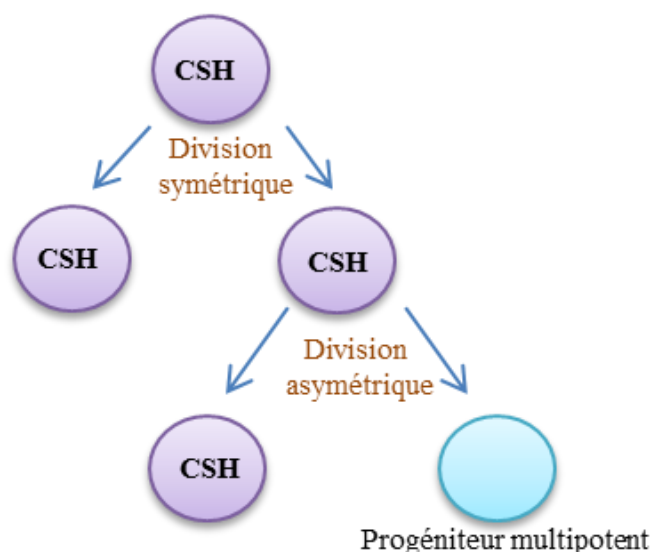


Figure 10 : Modèle de division des cellules souches hématopoïétiques normales

b) Niche hématopoïétique au cours de la LMC.

Il existe un grand nombre de données expérimentales concernant la « niche » hématopoïétique au cours de la LMC. La première notion établie après plusieurs années de controverses est le fait que les cellules stromales de la moelle osseuse ne font pas partie du clone leucémique car elles ne portent pas le chromosome Ph. Cependant depuis quelques années, certaines données expérimentales émergent et questionnent la « normalité » de la niche (développé partie 9g).

Des travaux classiques plus anciens avaient montré que des anomalies fonctionnelles et conformationnelles de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines VLA4/5 entraînent la perte d'adhérence normale des cellules souches leucémiques (CSL) au niveau de la niche. De plus ces cellules souches ont une réponse réduite au chimiotactisme du CXCL12 ce qui entraîne une diminution du homing médullaire. On sait également que BCR-ABL affecte de manière dose-dépendante la signalisation SDF1/CXCR4 et l'expression même du récepteur au niveau des cellules leucémiques (Geay et al., 2005).

Ces défauts d'adhésions expliquent la sortie précoce des cellules leucémiques de la niche (Foudi, 2006) et la perte de contrôle par le stroma, conduisant à l'augmentation de la prolifération des cellules souches et des progéniteurs leucémiques.

7. Thérapies

a) Historique bref

L'utilisation de la radiothérapie constituait la première thérapeutique efficace de la LMC. Elle avait notamment pour but, de réduire la taille de la rate en particulier chez les patients présentant une splénomégalie majeure. Jusqu'aux années 1970, l'administration de Busulfan et de l'hydroxyurée représentait la base thérapeutique de la LMC. Ces thérapies n'ont cependant jamais pu montrer un avantage de survie et surtout n'ont pas permis de modifier l'histoire naturelle de l'évolution de la maladie vers la crise blastique après un délai de 3 à 5 ans en moyenne (Hehlmann et al., 1993).

L'utilisation de la greffe de moelle osseuse allogénique a changé de manière drastique la prise en charge de la maladie. Elle a été la première et reste la seule thérapie curative de la LMC (Gaziev et al., 2002; Stamatovic et al., 2012). La greffe allogénique nécessitait cependant la disponibilité d'un donneur et surtout un état physiologique satisfaisant chez le patient jeune, ce qui n'était pas le cas pour la plupart des patients atteints de LMC. Des tentatives d'autogreffe ont également été réalisées après un recueil de cellules souches suite à une chimiothérapie lourde. Les cellules souches recueillies lors de la sortie d'aplasie chez ces patients étaient majoritairement Ph-négatives et devaient ainsi permettre la reconstitution d'une hématopoïèse normale (Carella, 1991). Ce traitement lourd n'a pas montré un avantage de survie.

L'introduction à l'interféron au début des années 1980 a été la première avancée permettant une augmentation du taux de survie des patients répondeurs avec la possibilité d'obtenir une rémission cytogénétique (Hehlmann et al., 1994). Enfin, l'association de l'Aracytine à l'interféron a été montrée comme étant extrêmement efficace sur le plan de la réponse cytogénétique. Cette association est donc devenue le standard thérapeutique au début des années 1990 (Guilhot et al., 1997).

Les progrès obtenus dans la compréhension de la signalisation de BCR-ABL ont permis d'envisager dès le début des années 1990, la possibilité de développer des inhibiteurs de son activité tyrosine kinase. Les premiers inhibiteurs désignés sous le terme de « tyrphostines » ont ainsi été développés pour la première fois par l'équipe de Levitzki (Anafi, 1992). Ces « tyrphostines » étaient extrêmement efficaces dans des lignées cellulaires comme K562 mais elles présentaient une toxicité les rendant inutilisables chez l'homme.

Une classe d'inhibiteurs initialement développée contre le récepteur du PDGF a montré un effet positif sur l'activité kinase d'ABL. Elle fut donc testée par la compagnie pharmaceutique Ciba-Geigy (actuel Novartis) en 1996 dans les cellules transformées par BCR-ABL puis ; pour la première fois ; sur les cellules leucémiques primaires de patients atteints de LMC par l'équipe de B. Druker à Portland. Cette étude a été la base du développement du premier inhibiteur qui a changé l'histoire de la maladie. L'abstract de cet article se terminait par la phrase suivante : « ce produit pourrait être utile dans le traitement des leucémies exprimant BCR-ABL » (Druker, 1996). Cette hypothèse a pu être testée au cours de l'essai clinique comparant le traitement jusqu'alors standard IFN/ARA-C à l'inhibiteur tyrosine kinase (ITK) initialement désigné STI 571 puis Imatinib ou Glivec. Cet essai « IRIS » a montré un avantage immédiat en terme de réponse cytogénétique et moléculaire. Il est donc devenu dès les années 2000, le traitement standard de première ligne de la LMC. L'utilisation de l'Imatinib a permis de prolonger la survie des patients répondeurs, à une durée équivalente à celle de la population générale au même âge (O'Brien et al., 2003).

L'Imatinib s'administre par voie orale sous forme de comprimé de 400 mg /jour. Il exerce son activité en se fixant à la conformation inactive (fermée) de la poche ATP du domaine kinase de BCR-ABL (**figure 11**). La mise à jour de cet essai a montré que près de 60% des patients avec une réponse moléculaire majeure (diminution de 3-log du transcrit BCR-ABL par rapport au diagnostic) restaient sous traitement après 6-8 ans tandis que 30-40% développaient une intolérance ou une résistance à la drogue. Ces résistances impliquent de nombreux mécanismes, notamment des mutations du domaine ABL-kinase, nécessitant le développement de nouveaux ITK. Ainsi, des ITK de 2^{ème} génération (nilotinib/AMN 107, dasatinib/BMS-354825 et bosutinib/SKI-606) puis de 3^{ème} génération (ponatinib/AP24534) ont donc pu être développés. Actuellement, le choix des traitements tend à se personnaliser pour chaque patient adulte en fonction des statuts de co-morbidités et des mécanismes de résistance, notamment les mutations qui sont systématiquement recherchées en cas d'augmentation du transcrit BCR-ABL au niveau du sang périphérique.

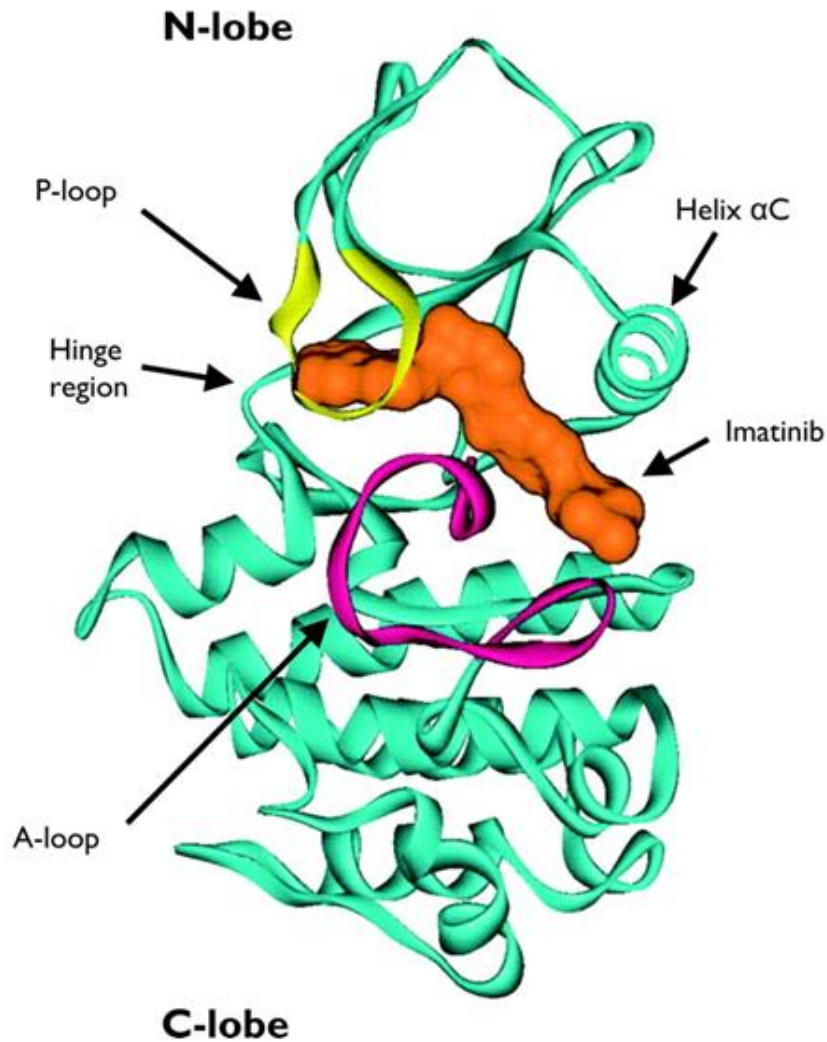


Figure 11 : Représentation de la structure en 3D du domaine kinase ABL1 (vert) complexé avec l'imatinib (orange) (Quintás-Cardama and Cortes, 2009). Le site de liaison à l'ATP dans le domaine kinase ABL1 est situé entre la boucle d'activation (« A-loop », magenta) et la boucle de liaison au phosphate (« P-loop »; jaune). La boucle A contrôle l'activité catalytique d'ABL1 en « switchant » ces différents états en fonction de la phosphorylation. L'Imatinib s'insère sous l'hélice αC dans le lobe NH₂-terminale de la protéine, bloque l'ATP et piège la kinase sous sa conformation inactive.

b) Spécificité des iTKs

L'Imatinib, comme la plupart des iTKs, agit en tant que compétiteur de l'ATP au niveau de la poche ATP kinase de la protéine ABL. Malgré son action assez spécifique sur l'activité kinase de BCR-ABL, il a d'autres cibles comme les récepteurs KIT, PDGFRA/B (Buchdunger et al., 2000) et ARG (Okuda et al., 2001).

Les inhibiteurs de 2^{ème} génération sont tous notablement plus efficaces que l'imatinib avec une activité 30 à 200 fois supérieure selon l'iTK, évaluée par leurs IC50 des lignées exprimant BCR-ABL. Le nilotinib est structurellement et biologiquement semblable à l'imatinib. Tout comme le dasatinib, il inhibe également les kinases de la famille SRC, KIT et PDGFR. Le spectre d'activité du bosutinib est légèrement différent avec une absence d'inhibition des récepteurs KIT et PDGF.

Le ponatinib et le dasatinib sont les seuls iTK à fixer les conformations actives et inactives de BCR-ABL (Modugno, 2014). Ponatinib est le plus puissant des iTKs contre les résistances mutations-dépendantes, notamment la mutation T315I substituant une thréonine à une isoleucine au niveau de la boucle P du domaine kinase d'ABL. Il peut également inhiber les kinases telles que le VEGF, le FGFR1, cKIT, celles de la famille SRC, LCK, TIE2, RET, EPH, PDGF et FLT3.

De nouvelles molécules comme le rebastinib sont en cours d'essai clinique. Également actif contre les clones T315I, le rebastinib peut lier une région appelée « switch pocket » et empêcher BCR-ABL d'adopter sa conformation active. L'omacetaxine mepesuccinate est une plante alcaloïde de Chine qui est connue de longue date et, qui est efficace pour inhiber les cellules leucémiques exprimant T315I. Il a la capacité d'inhiber la synthèse de Bcl-2, cible clé de la signalisation induite par BCR-ABL (Mughal et al., 2016) mais a cependant une forte action myélosuppressive.

8. Résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinase

Les résistances aux ITK peuvent se définir sur le plan clinique et biologique. Nous détaillerons ici seulement les mécanismes biologiques.

a. Mécanismes faisant intervenir l'activité de BCR-ABL

Les principaux mécanismes de résistance dont l'apparition est liée à BCR-ABL sont la survenue de mutations au niveau du domaine kinase de BCR-ABL et une amplification du gène. L'un conduit à une perte de fixation de l'iTK par substitution d'un acide aminé et l'autre à une forte augmentation de l'activité kinase de l'oncoprotéine.

Toutes les mutations du domaine tyrosine kinase n'engendrent pas une résistance mais certaines mutations cliniquement relevantes sont bien connues et confèrent différents degrés de résistance. La mutation T315I est la plus sévère et conduit à une résistance aux iTKs de première et deuxième générations (**figure 12**). Elle survient au niveau du site de fixation de l'imatinib tout comme la mutation F317L. Le site de fixation de l'imatinib se trouve au niveau de la boucle p qui est également le site de fixation de l'ATP. À ce niveau on peut retrouver les mutations G250E, Q252E/H, Y253F/H ou encore E255K/V. Au niveau de la boucle d'activation on retrouve les mutations M351T, F359C/V et au niveau du site catalytique la mutation H396P/R (Chomel and Turhan, 2011) (**figure 12**).

Les mutations du domaine kinase de BCR-ABL peuvent être à l'origine de résistances primaires ou secondaires et leurs proportions augmentent avec l'avancement de la maladie et les lignes de traitements. Il a été montré que les mutations BCR-ABL préexistaient au traitement par ITK (Roche-Lestienne and Preudhomme, 2003) qui sélectionne les clones résistants, avec une augmentation de la fréquence des mutations lors des phases avancées (Soverini et al., 2006).

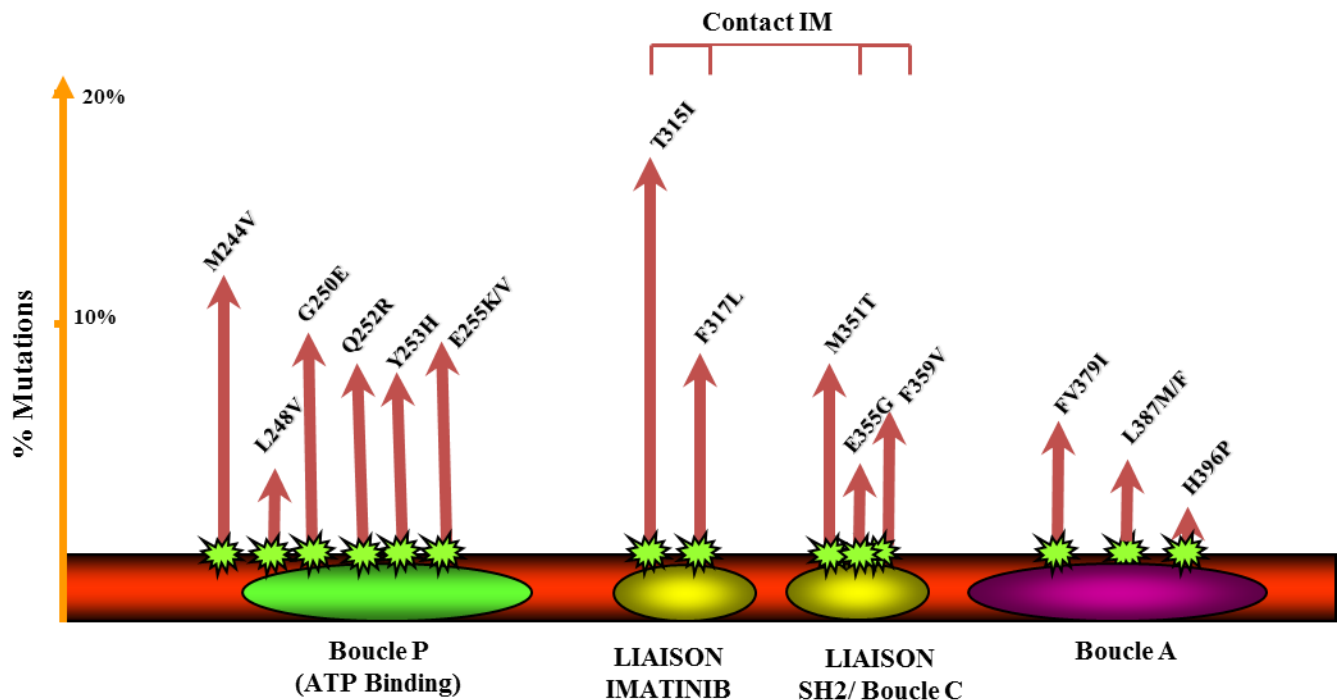


Figure 12 : Représentation des mutations au niveau du domaine kinase de BCR-ABL. Les étoiles représentent les sites protéiques générés par les mutations. La hauteur des flèches (rouge) représentent le pourcentage de patients présentant une mutation donnée.

b. Mécanismes non liés à l'activité de BCR-ABL

La résistance aux ITK peut être liée à des causes indépendantes de l'activité TK de BCR-ABL. Parmi ces causes, on a pu identifier les voies de signalisations suivantes : **(figure 13)**.

- ABCB1/P-gp

La surexpression des pompes d'efflux ABCB1/P-gp (P-glycoprotein) et ABCG2/BCRP (breast cancer related protein) est un des mécanismes majeurs de résistance de la LMC et des cellules tumorales en général pour échapper à l'apoptose induite par les thérapies (Chomel and Turhan, 2011; Nestal de Moraes et al., 2012).

ABCB1 est une glycoprotéine exprimée à la surface de nombreux types cellulaires et qui altère la perméabilité de la membrane plasmique pour diminuer la concentration intracellulaire en drogue. Sa fonction physiologique est la protection de la cellule contre les composés toxiques.

Le NFκB est un facteur de transcription qui contrôle la mort cellulaire, l'inflammation et les processus immunitaires. La voie du NFκB induit une augmentation du niveau d'expression d'ABCB1 *in vitro* conduisant au mécanisme de chimiorésistance dans la lignée K562.

Dans les LMC qui expriment BCR-ABL, ABCG2 induirait une résistance à l'imatinib dépendante du niveau d'expression de BCR-ABL, ce qui suggère un contrôle d'ABCG2 par ce dernier (Nakanishi, 2006).

- OCT1/SLC22A1

OCT1/SLC22A1 est un transporteur soluble permettant l'influx de solutés passivement à travers la membrane plasmique sans dépense d'énergie. La famille de transporteur dont il fait partie joue un rôle physiologique sur l'import/export de neurotransmetteurs, de nutriments et de métabolites. OCT1 exerce un rôle important au niveau de l'absorption et de l'excrétion comme en témoigne son expression prédominante dans les intestins, le foie et les reins.

Il a été montré qu'OCT1 permet l'entrée de l'imatinib dans la cellule. Son activité sert de marqueur moléculaire de la réponse cytogénétique après 6 mois de traitement et les mauvais répondeurs ont un faible niveau d'expression d'OCT1 comparé aux bons répondeurs (Chomel and Turhan, 2011; Nestal de Moraes et al., 2012).

- IAP, XIAP et Survivine

Les protéines IAP (protéines inhibitrices d'apoptose) XIAP (X linked of inhibitor of apoptosis protein) et Survivine sont également des acteurs majeurs de résistance aux ITK (Silva et al., 2013).

XIAP assure la maintenance de l'homéostasie cellulaire et inhibe l'apoptose. Son expression dans les cancers est un marqueur de mauvais pronostic (Che et al., 2012; Yang et al., 2012; Zhou et al., 2014).

La survivine a aussi une action anti-apoptotique. Elle régule la division cellulaire en contrôlant le fuseau mitotique. Il a été montré que l'expression de survivine était surexprimée dans les cellules de LMC et notamment au cours des phases accélérées et blastiques (Conte et al., 2005). Elle jouerait ainsi un rôle dans la progression tumorale. En aval de la voie PI3K, les facteurs de transcription de la famille FOXO induisent des mécanismes de résistance via FOXO3a et FOXO1. Tous deux sont capables de fixer le promoteur du gène codant la protéine Survivine et inhibent ainsi son expression. FOXO3a peut également fixer le promoteur du gène ABCB1 et induire sa transcription *in vitro* (Nestal de Moraes et al., 2012).

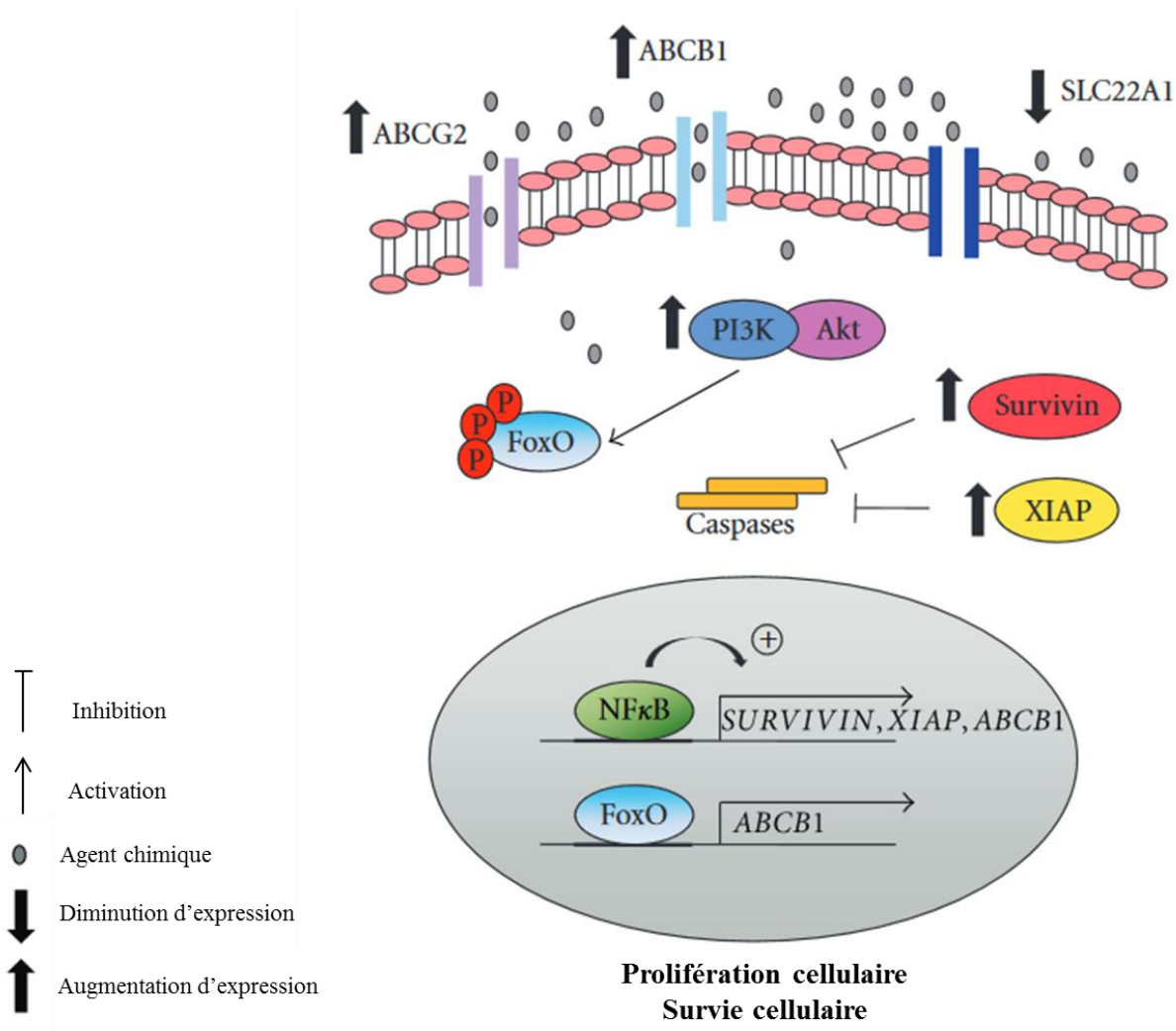


Figure 13 : Mécanismes de résistance des CSL de LMC (Adapté de (Nestal de Moraes et al., 2012)). Les cellules résistantes de LMC expriment constitutivement le facteur de transcription NFκB dans le noyau, qui stimule la transcription de l'IAP Survivine, de XIAP ainsi que du transporteur ABCB1. L'activation constitutive de la transcription de FOXO3a via la voie PI3K/Akt, peut également conduire à la transcription d'ABCB1. Les cellules résistantes aux ITK présentent également une surexpression de la pompe d'efflux ABCG2 et une diminution de SLC22A1. Ces modifications d'expression conduisent à une diminution de l'apoptose par inhibition des caspases.

9. Cellules souches leucémiques (CSL) de LMC

a) Phénotype des CSL de LMC

Plusieurs travaux ont étudié les marqueurs de surface des cellules souches de LMC au cours des dernières années (Chomel and Turhan, 2011). Jusqu'à récemment, aucune différence n'avait pu être mise en évidence entre les CSL de LMC et les CSH normales, avec notamment l'expression de marqueurs communs $CD34^+CD38^-CD71^-Lin^-$. Ce défaut de marqueurs spécifiques pose le problème de l'identification des CSL en réponse aux thérapies ciblées et dans le cadre de la détection des CSL résiduelles. Plus récemment, plusieurs travaux semblent montrer que les CSL de LMC exprimeraient des marqueurs comme l'IL1RAP (Zhao et al., 2013), le CD26 (Herrmann et al., 2014), le CD93 (Kinstrie, 2015) et le CD25 (Sadovnik et al., 2016). Les marqueurs CD25 (Zhou, 2014) et IL1RAP (Ågerstam et al., 2015) semblent également être présents dans les cellules souches de LAM tandis que le CD26 et le CD93 seraient restreints aux CSL de LMC.

b) Phénomène de persistance de CSL chez les patients en rémission

Au cours de l'essai clinique STIM réalisé en France, il a été montré que l'arrêt du traitement chez les patients en rémission moléculaire profonde entraînait une rechute dans environ 60% des cas, notamment au cours des 6 mois suivant l'arrêt (Mahon et al., 2010). Ces résultats ont été confirmés dans d'autres études cliniques notamment en Corée (Lee et al., 2016) et en Australie (Ross et al., 2013). La persistance des cellules souches leucémiques pourrait être à l'origine de ce phénomène de rechute. La mise en évidence des CSL résiduelles dans la MO de patients en rémission moléculaire profonde a été abordée par différents travaux. En effet, l'utilisation de la technique de culture à long terme (LTC-IC) a permis d'observer la présence de cellules clonogéniques leucémiques exprimant BCR-ABL (Chomel et al., 2011). Ce phénomène a été confirmé par l'équipe de Ravi Bhatia. Grâce à la technique de SCID-RC, il a montré que dans certaines expériences de greffe, le pourcentage de CSL augmentait en fonction de la durée d'exposition aux ITK (Chu et al., 2011). Ces résultats confirment ceux obtenus *in vitro* par l'équipe de Tessa Holyoake, qui a montré que les CSL quiescentes de LMC étaient résistantes à l'Imatinib (Graham et al., 2002).

Les phénomènes à l'origine de la persistance des CSL sont actuellement en cours d'investigation dans plusieurs laboratoires. L'existence de mécanismes indépendants de l'activité TK de l'oncogène, démontrée par les travaux de Deininger (Eiring et al., 2011), a stimulé la recherche de voies de signalisation activées dans les CSL. Le tableau 1 montre les voies de signalisation impliquées dans les CSL de LMC (**tableau 1**). Nous détaillerons quelques voies de signalisation qui ont été démontrées comme étant de possibles cibles thérapeutiques.

Liste de gènes	Composés potentiels	Essais cliniques potentiels
SHH : Smo, Gli, Ptchd	Inhibiteurs SMO	Imatinib + inhibiteurs SMO
PML	Arsenic	Imatinib + Arsenic
STAT5	Pimozide, Gliptines, Pioglitazones	ITK + composé x
RAD52	Aptamers F47	Imatinib + Aptamers
Alox5a	Zileuton	Dasatinib + Zileuton

Tableau 1 : Voies de signalisation impliquées dans les CSL de LMC et essais cliniques potentiels

- 1 - La voie Sonic Hedgehog (Shh) est impliquée dans l'hématopoïèse adulte et primitive. Elle joue un rôle dans le développement embryonnaire, la régénération tissulaire et la maintenance des cellules souches leucémiques. Dans les conditions normales, son récepteur Patched (PTC) inhibe la protéine SMO, intermédiaire du signal. Lorsque le ligand Hedgehog (Hh) fixe PTC, SMO est relargué et active la transcription des facteurs de transcription Gli1 ou Gli2 qui induisent BCL2, Ptch1, Cycline D1 ou encore le mécanisme d'angiogénèse avec le VEGF. Des études récentes ont montré que le ligand Hh, la protéine SMO et le facteur de transcription Gli1 sont surexprimés dans les cellules souches leucémiques et potentialisés en phase accélérée. De plus chez la souris, la délétion de SMO conduit à la diminution des facteurs Gli et à la déplétion spécifique des CSL. Dans la LMC, la maintenance des CSL est assurée par l'augmentation de Gli1 mais l'augmentation de Gli2 est associée à la phase blastique. L'inhibition de Gli2 conduit à l'entrée en cycle des CSL et une augmentation de la sensibilité aux ITKs. Cette évolution suggère un rôle de la voie dans la survie des CSL et la progression de la maladie (Hu and Li, 2016; Sadarangani et al., 2015). Les inhibiteurs de SMO ont été développés et testés chez les patients atteints de LMC résistants aux ITK, mais on a observé une toxicité importante qui empêche actuellement leur développement en routine.

- 2 - La voie Wnt est un acteur majeur de l'autorenouvellement et du maintien à long terme des CSH normales. La glycoprotéine Wnt, présente au sein de la MO, lie son récepteur Frizzled couplé à ses corécepteurs LRP5 ou LRP6 (low density lipoprotein receptor related protein). La transduction du signal dans le milieu interne de la cellule se fait par la β -caténine (β cat) qui s'accumule et est transloquée au noyau. Une fois nucléaire, la β cat remplace le corépresseur GRG (Groucho related gene family) sur le facteur de transcription TCF/LEF (T cell factor/ lymphoid enhancer factor) et induit la transcription des gènes cibles comme c-MYC, c-JUN, CyclineD1 ou la fibronectine.

La voie Wnt/ β cat et l'expression de ses gènes cibles augmentent dans les cellules de LMC mais en particulier dans les CSL. Après greffe de cellules souches β cat^{-/-}, les souris ne développent pas de LMC et ne reconstituent pas la moelle osseuse lors de greffes secondaires. La β cat contrôle donc l'autorenouvellement et le maintien à long terme des CSL.

Les membres de la famille HOX sont reliés aux gènes Cdx (Cdx 1, 2 et 4) qui sont impliqués dans les voies Wnt et BMP. Ils formeraient un complexe avec PBX2 et MEIS1 pour induire la leucémie et perturber la différenciation myéloïde. Dans la LMC, HOXA9 est requis pour l'autorenouvellement des CSL et son expression est un marqueur de mauvais pronostic (Hu and Li, 2016).

- 3 - L'Alox5 (arachidonate 5-lipoxygénase) est une molécule spécifique de la régulation de la survie des CSL de LMC. Le gène ALOX5a conduit à la génération de 5-LO (5-lipoxygénase) responsable de la biosynthèse de la Leucotriene A4 (LTA4) à partir de l'acide arachidonique.

La 5-LO est activée par la protéine FLAP (5 lipoxygenase activating protein), une protéine liée à la membrane nucléaire et capable de capter l'acide arachidonique. Il a été montré que l'expression de ALOX5a augmentait chez les patients atteints de LMC (Graham et al., 2007) et que les souris Alox5a^{-/-} étaient résistantes au développement de LMC murine (Chen et al., 2009). Un inhibiteur de Alox5a, le Zileuton, est un médicament qui est actuellement en essai clinique en association avec Dasatinib.

c) SIRT1

SIRT1 est une protéine déacétylase dont l'expression a été rapportée comme étant augmentée dans les cellules leucémiques des patients atteints de LMC (Yuan et al., 2012). Son expression est régulée par la voie BCR-ABL/STAT5 et inhibe le contrôle qu'exerce la voie p53/FOXO sur la maintenance des CSL prolongeant ainsi leurs survies. Chez la souris, l'inactivation de SIRT1 inhibe le développement d'une LMC et la diminution de son expression inhibe la progression. SIRT1 contrôle la protéine de réparation de l'ADN Ku70 dans les lignées de LMC et augmente la réparation moins fiable du système NHEJ (Non-Homologous End-Joining) (Wang et al., 2013). Par ce mécanisme, SIRT1 permet d'augmenter les mutations au niveau de l'ADN. L'induction de la survie des CSL et l'augmentation de l'instabilité génétique sont des indicateurs du rôle majeur de SIRT1 dans le développement de la phase blastique.

d) ARN et microARN

Certains ARN et microARN peuvent moduler les CSL ou les progéniteurs leucémiques et sont des acteurs majeurs de la progression de la maladie (Hu and Li, 2016).

- Le gène Musashi-2 (MSI-2) est associé au développement des cellules souches hématopoïétiques et impliqué dans le déclenchement d'un phénotype proche de la crise blastique chez la souris. En effet, les souris MSI-2 présentent un blocage de la différenciation myéloïde et une expansion des progéniteurs. Cet ARN est surexprimé au cours de la phase blastique chez les patients atteints de LMC. Il interagirait avec des gènes associés au mécanisme d'autorenouvellement.

- ADAR1 est un ARN éditeur qui convertit les adénosines en inosines sur l'ARN. Cette édition entraîne une mauvaise interprétation par les ribosomes. ADAR1 cible le pré-microARN Let-7 qui s'autorégule avec LIN28B et promeut l'autorenouvellement des CSL. ADAR1 est augmenté lors de la progression vers la phase blastique de manière dépendante au niveau d'expression de BCR-ABL. La diminution d'ADAR1 dans des modèles murins induit la perte des cellules leucémiques primitives et l'impossibilité de développer une LMC.

- Le gène C/EBP α est nécessaire pour la différenciation myéloïde. Son expression diminue dans les lignées de LMC. BCR-ABL régule négativement son expression en induisant la surexpression de l'ARN hnRNP-E2. Les patients en crise blastique ont une perte d'expression de C/EBP α et une augmentation d'expression de hnRNP-E2 directement proportionnelle au niveau de BCR-ABL.

- Enfin le miRNA150 a été détecté à des taux plus faibles dans les cellules leucémiques de patients atteints de LMC. L'une des cibles de ce miRNA est le facteur de transcription MYB dont il réprime l'expression.

e) Microenvironnement

En plus de la perte du contrôle par les cellules stromales (abordé partie 5b), il semblerait qu'il existe un « cross-talk » entre la niche et les cellules leucémiques qui modifierait le profil des CSM (Chomel and Turhan, 2011; Chomel et al., 2014). En effet, il a été rapporté que les cellules leucémiques de patients atteints de LMC modifient l'expression de certains gènes au niveau des CSM, en induisant la sécrétion de PlGF (Placental derived growth factor) qui stimulerait la prolifération des CSL résiduelles ainsi que l'angiogénèse. En effet, le PlGF appartient à la famille du VEGF (vascular epithelial growth factor) qui est un inducteur du mécanisme d'angiogénèse. Cette sécrétion serait induite par BCR-ABL via la voie du NFκB après liaison entre les CSL (VLA4) et les MSC (VCAM1).

Les CSL interagissent avec les cellules du microenvironnement via leurs récepteurs tels que les intégrines, CXCR4 et Tie2 qui reconnaissent respectivement l'ostéopontine, SDF1 et Angiopoïétine (Ang-1), ces interactions contribuant à leur quiescence (**figure 14**, extrait de (Chomel and Turhan, 2011)).

Le CD44 joue également un rôle critique dans le homing des CSL. Le modèle murin CD44 déficient entraîne une diminution du homing qui explique la diminution des CSL dans la moelle et la perte d'induction de la LMC par BCR-ABL (Krause et al., 2006).

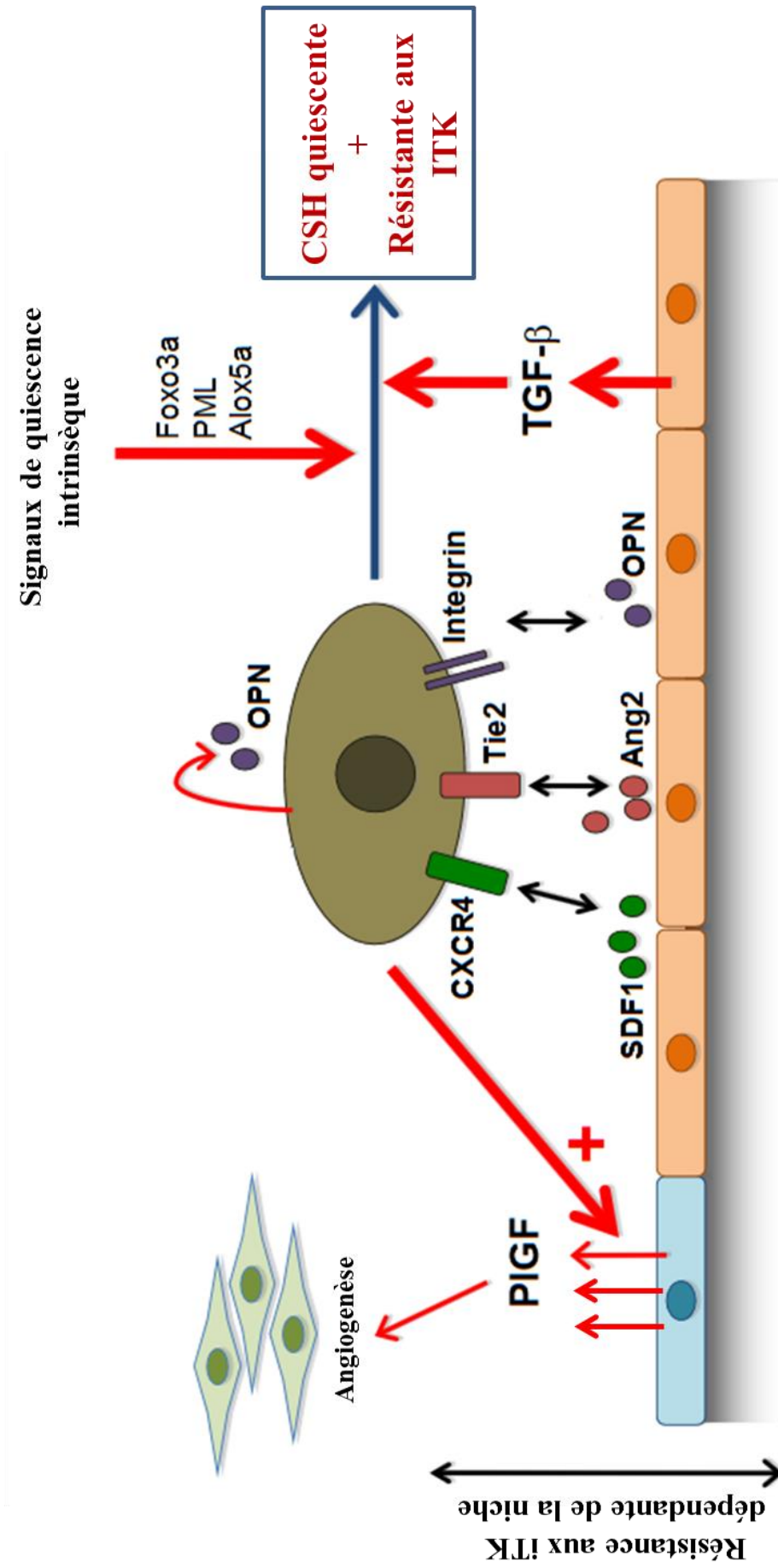


Figure 14: Quiescence et chimiorésistance des CSL induites par la « niche » médullaire. Les flèches représentent les états d'activation. PlGF, Placental Growth Factor; CXCR4, C-X-C chemokine receptor type 4; SDF-1 α , stromal cell-derived factor-1 α ; Tie2, tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains; ang2, angiopoietin 2; OPN, osteopontin; TGF- β , Transforming growth factor-beta.

10. Physiopathologie de la crise blastique

La crise blastique est caractérisée par un blocage de la différenciation des cellules leucémiques avec une accumulation de blastes indifférenciés dans la moelle osseuse et le sang périphérique. Dans la majorité des cas il s'agit d'une leucémie aigüe myéloïde mais elle peut être lymphoblastique ou indifférenciée. Elle est souvent mais pas toujours précédée d'une phase d'accélération. Cette phase d'accélération est suspectée devant la présence de 10 à 19% de cellules blastiques au niveau de la MO ou du sang périphérique, d'une thrombocytopénie persistante inexplicée ou à l'inverse d'une thrombocytose et, enfin, devant l'apparition d'une splénomégalie.

La progression de la leucémie de la phase chronique à la phase blastique est induite par une accumulation d'anomalies additionnelles provoquant l'apparition ou la sélection de plusieurs clones malins. Les défauts de réparation d'ADN qu'entraîne l'expression de BCR-ABL dans la cellule est communément considérée comme la cause majeure de cette instabilité génétique (Calabretta and Perrotti, 2004; Shet et al., 2002) (**figure 15**).

a) Evènements génétiques additionnels

La survenue d'évènements génomiques additionnels au cours de l'évolution de la maladie a été démontrée par des analyses cytogénétiques lors de myélogrammes successifs pratiqués chez ces patients. Ces anomalies sont classifiées comme étant de type majeure « major route » ou mineure « minor route ». Les anomalies « major route », qui sont +8, +19, un second Ph et i(17q) ; sont retrouvées chez 70 à 80% des patients, tandis que les anomalies de type « minor route » ; -7, -17, -Y, +17 et +21 ; sont observées chez 15% des patients. Il a ainsi été montré que la duplication du chromosome Ph lui-même est une des anomalies rencontrées, avec comme conséquence une duplication de l'oncogène de fusion BCR-ABL (Shet et al., 2002).

Au niveau moléculaire, l'aberration la plus fréquente est la délétion p53 localisée sur le bras court du chromosome 17. On observe également dans 50% des cas de crise blastique lymphoïde, une délétion homozygote du gène p16INK4 localisé sur le chromosome 9. Moins fréquemment on retrouve une surexpression de C-MYC, N-RAS ou encore l'apparition d'un oncogène de fusion AML-EVI1.

b) Défauts de réparation d'ADN

BCR-ABL a été montré dans de nombreuses études comme étant un puissant modulateur de différents acteurs majeurs de la réponse aux endommagements causés à l'ADN (DDR). Il agit probablement de deux manières, d'une part en provoquant un stress oxydatif (Flis et al., 2012; Nieborowska-Skorska et al., 2012) et d'autre part en interférant directement avec les mécanismes de réparation d'ADN. Dans ce cadre, il a été montré que BCR-ABL était directement responsable d'un phénotype dit « mutateur » (Canitrot et al., 1999).

L'activité kinase de BCR-ABL est directement responsable de l'apparition d'un stress oxydatif accru dans les cellules leucémiques (Koptyra et al., 2008). L'équipe de Skorski montre également qu'une instabilité par cassures doubles brins d'ADN, suite à des stress oxydants, entraîne une réparation retardée et diminuée dans les cellules de LMC (Skorski, 2002).

Depuis les années 2000, il a été montré que BCR-ABL interagissait avec deux voies de réparation majeures : la voie de réparation non-homologue (NHEJ) (Poplawski and Blasiak, 2010) et la voie de recombinaison homologue (Skorski, 2002). En effet, BCR-ABL entraînerait une diminution de l'expression de la protéine DNA-PKcs dans les systèmes expérimentaux murins et humains (lignées stables ou inductibles), via une action du protéasome induite par l'activité kinase de BCR-ABL (Deutsch et al., 2001).

De même, BCR-ABL entraînerait une diminution de l'expression de BRCA1, protéine majeure dans le maintien de l'intégrité du génome (Deutsch et al., 2003). Cependant les mécanismes impliqués dans cette réduction dans les cellules leucémiques sont peu connus.

Récemment la possibilité de l'intervention de BAP1 (BRCA-1 associated protein 1) a été démontrée (Dkhissi et al., 2015). BAP1 est un gène suppresseur de tumeur codant une ubiquitine carboxyterminal hydrolase nucléaire qui interagit avec BRCA1 et d'autres régulateurs du cycle cellulaire. Il est un acteur majeur du système ubiquitine protéasome en réponse aux dommages causés sur l'ADN. BCR-ABL induit la diminution de BAP1 dans les lignées expérimentales de LMC et également dans les cellules primaires CD34⁺ de patients. Sa diminution réduit également la stabilité protéique de BRCA1 (Dkhissi et al., 2015).

Enfin, l'altération du système de réparation de l'ADN par BCR-ABL impliquerait également les protéines BLOOM (Slupianek et al., 2005) et WRN (Slupianek et al., 2011).

c) Activation d'oncogènes au cours de la crise blastique

La translocation additionnelle t(3;21) à l'origine de la protéine de fusion AML/EV11 participe également au blocage de la différenciation et à l'augmentation de la prolifération observée au cours de la phase blastique (Kurokawa et al., 1998; Phan et al., 2008). L'expression d'autres gènes comme HOXA9 (Dash et al., 2002) et Lin28 (Viswanathan et al., 2009) a été rapportée comme étant des facteurs potentiels de progression.

c-MYC, qui joue un rôle dans l'initiation de la transformation (Sawyers, 1993), a une expression augmentée chez certains patients en phase blastique (Boros and Williams, 1998). Cette augmentation survient par stimulation de la transcription, après apparition d'une trisomie 8 ou encore suite à la stabilisation de son ARNm par polyadénylation.

d) Inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (Calabretta and Perrotti, 2004)

Dans un système biologique normal, des dommages causés à l'ADN entraînent l'activation de la protéine ATM (Ataxia telangiectasia mutated). Cette dernière induit, via p53, une cascade de signaux conduisant non seulement à l'expression de protéines telles que BAX, CD95 ou DR5 mais aussi à celle de gènes impliqués dans le blocage du cycle cellulaire afin de permettre la réparation.

- TP53, qui joue un rôle central dans ce contexte, est localisé sur le chromosome 17 et est retrouvé inactivé dans 25% des cas de crise blastique myéloïde. Cette perte de p53 peut être le résultat des délétions, des mutations ou des réarrangements. Un mutant p53 peut agir comme un dominant négatif sur les autres isoformes et coopérer avec BCR-ABL pour stimuler la prolifération.

- P16INK4a sur le chromosome 9 est un inhibiteur de la Cycline D, une kinase du cycle cellulaire. Elle a pour rôle de phosphoryler la protéine Rb contrôlant les cellules en phase G1. Les délétions p16 sont observées fréquemment dans la crise blastique lymphoïde.

- IRF8 (interféron regulatory factor 8) est un gène suppresseur dont la délétion chez la souris est suffisante pour déclencher un syndrome myéloprolifératif proche de la LMC avec une splénomégalie, une hyperleucocytose et une progression vers un phénotype proche de la crise blastique. L'expression d'IRF8 est diminuée dans les cellules de LMC via la voie BCR-ABL1/STAT5.

e) Echappement aux signaux de mort cellulaire

L'échappement aux signaux de mort cellulaire par apoptose est un mécanisme majeur de résistance des cellules leucémiques au traitement conduisant à la progression tumorale (Calabretta and Perrotti, 2004). Ce mécanisme implique l'activation par phosphorylation de la voie PI3K/AKT(PKB)/STAT5 par BCR-ABL. L'activation de la PI3K induit la phosphorylation et l'inactivation de la protéine pro-apoptotique BAD qui se lie à la protéine chaperonne 14-3-3 et reste bloqué dans le cytoplasme. Ainsi les protéines anti-apoptotiques BCL2 et BCL-xL induites par STAT5 vont pouvoir exercer leurs fonctions sur la mitochondrie. Ces interactions sont résumées dans la figure 15.

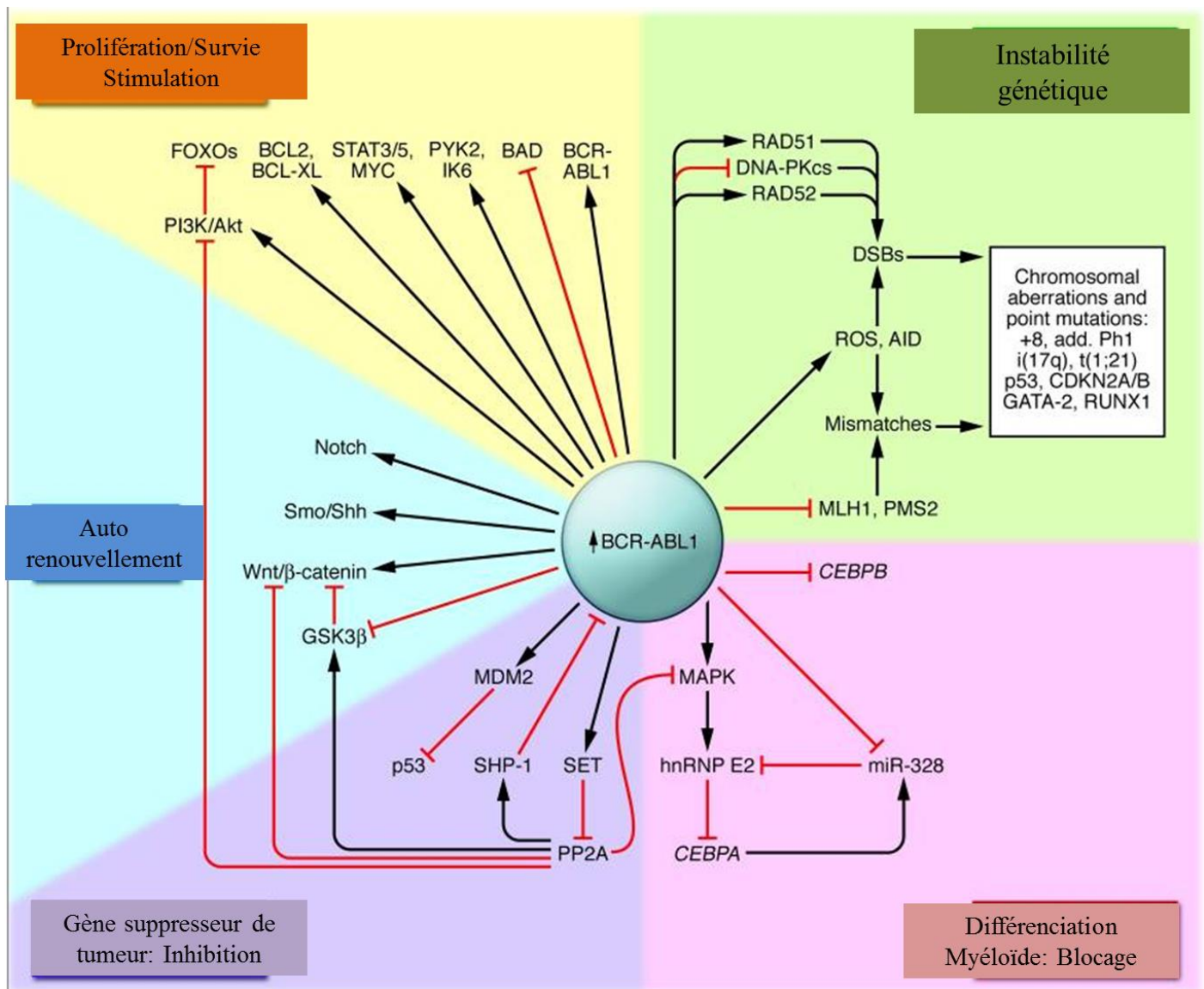


Figure 15 : Représentation schématique des modifications induites par BCR-ABL au cours de la transformation blastique (d'après (Perrotti et al., 2010)).

11. Modèles d'étude de la LMC

a) Lignées cellulaires de LMC

La majorité des lignées de LMC humaines sont issues de LAM ou LAL. Par exemple, la lignée K562 est la première lignée de LMC érythroïde humaine établie en 1975. Elle dérive d'une patiente en phase blastique. La lignée KCL-22 est créée à partir d'une patiente en phase blastique lymphoïde en 1981. Elle présente de nombreuses anomalies cytogénétiques et notamment une mutation p53. La lignée MEG-01 établie en 1985 par Oqura M est de type mégacaryoblastique et dérive de cellules de moelle osseuse d'un patient LMC en phase blastique. En 1995, la lignée KBM7 est développée à partir d'un patient en phase blastique.

D'autres modèles ont été développés, notamment par transduction du gène BCR-ABL dans les cellules humaines comme la lignée UT7 (Issaad et al., 2000). En effet, la lignée UT-7 érythromégacaryocytaires, isolée à partir des cellules blastiques d'une LAM et constitutivement dépendante du GM-CSF, a été transduite par BCR-ABL permettant de réaliser des travaux expérimentaux (Dugray et al., 2001; Issaad et al., 2000).

b) Modèles murins de LMC

De nombreux modèles murins de LMC ont été créés en ciblant le compartiment hématopoïétique et une expression contrôlée de BCR-ABL p190 ou p210. Les premiers modèles transgéniques p190 et p210 ont montré rapidement la mortalité dès le stade embryonnaire en témoignant probablement de la toxicité de l'activité TK de BCR-ABL dans ce contexte.

Le modèle murin le plus utilisé est celui de l'équipe de David Baltimore à Boston (Daley, 1990) qui a été la première à démontrer que la greffe de cellules de moelle après transduction rétrovirale du gène BCR-ABL entraînait chez la souris un syndrome myéloprolifératif. Pour générer ce modèle, les CSH murines ont été transduites avec un vecteur rétroviral contenant le cDNA BCR-ABL codant pour la protéine P210. Après transduction des CSH de moelle, ces dernières ont été greffées aux souris receveuses léthalement irradiées. Les souris greffées ont développé un syndrome myéloprolifératif semblable par certains aspects, à celui de l'homme (Daley, 1990).

Ces modèles ont été largement utilisés pour étudier différents aspects de la LMC : l'identification des gènes impliqués dans la progression de la maladie et la caractérisation des cellules souches leucémiques. Cependant ce modèle a des inconvénients. En effet la maladie est très agressive, entraînant la mort des souris quelques semaines après la greffe suite au développement d'un syndrome myéloprolifératif sévère avec une splénomégalie et des hémorragies pulmonaires dues à la prolifération de cellules myéloïdes dans les vaisseaux pulmonaires.

Pour résoudre ce problème, des modèles inductibles ont été développés dans lesquels l'expression de l'oncogène BCR-ABL est placée sous le contrôle de promoteurs sensibles à la tétracycline. Dans ces modèles, les souches TRE-BCR-ABL sont croisées avec une souche de souris transgénique exprimant le TET-transactivateur sous le contrôle de promoteur de plusieurs types. Ainsi, lorsque la tétracycline est administrée aux souris per os (eau de boisson), BCR-ABL est exprimée, entraînant une prolifération leucémique. Dans ces modèles, il a été montré que le promoteur contrôlant l'expression de BCR-ABL avait une importance majeure. En effet, l'utilisation des promoteur MMTV entraîne des leucémies lymphoïde pré-B (Huettnier et al., 2000), tandis que l'utilisation du promoteur de CD34 conduit au développement d'une maladie myéloproliférative avec une thrombocytose (Radomska et al., 1998). Enfin, un modèle plus récent, en utilisant le promoteur TAL (SCL) dans ce système, a permis l'obtention d'un modèle inductible avec génération d'une leucémie de type myéloïde en présence de TET (Koschmieder et al., 2005).

Dans d'autres études, des modèles de xénogreffe utilisant des échantillons de patients atteints de LMC ont été réalisés. Dans ce cas, des cellules de patients ou des lignées cellulaires provenant de patients à des stades différents de la maladie ont été greffées à des souris SCID (Clutterbuck et al., 1997) ou à des souris NOD/SCID (Eisterer et al., 2005). L'utilisation de ces modèles a permis d'obtenir de nombreuses données sur la physiopathologie moléculaire et cellulaire de la maladie.

Ces différents modèles avec leurs avantages et inconvénients ont permis de réaliser des progrès majeurs dans la compréhension des mécanismes de transformation et de tester l'efficacité des inhibiteurs de tyrosine kinase qui ont permis de changer le pronostic de la maladie.

c) Modèles de cellules souches embryonnaires CSE de LMC.

Depuis la première description en 1971 (Damjanov, 1971; Evans et Kaufman, 1981) des CSE murines, des progrès importants ont été réalisés dans les techniques d'induction de l'hématopoïèse *in vitro* à partir de ces cellules (L Thompson and O Manilay, 2011). Cependant, et encore aujourd'hui, il n'a pas été possible de générer des CSH à potentiel de reconstitution *in vivo* à partir des CSE murines. Les trois conditions qui ont permis de générer ce potentiel ont été d'une part la surexpression de HoxB4 (Kyba et al., 2002) et de Stat5 (Kyba et al., 2003) et d'autre part de BCR-ABL (Perlingeiro et al., 2001). En effet, l'équipe de Owen Witte a montré pour la première fois que l'expression de BCR-ABL sous une forme inductible était suffisante pour générer une expansion de progéniteurs multipotents à partir des CSE (Era and Witte, 2000). Le groupe de G.Daley a montré en 2001 que la surexpression de BCR-ABL dans les EB de souris permettait de révéler le potentiel souche des EB *in vitro* et *in vivo* (Peters et al., 2001). Les effets de BCR-ABL au stade pluripotent ont été testés par la suite par notre équipe, montrant que l'expression de BCR-ABL induisait dans les CSE murines l'activation de STAT3 (Coppo et al., 2003), responsable du maintien « souche » des CSE murines, comme cela a été démontré en utilisant des vecteurs STAT3-dominant-négatifs (Coppo et al., 2003). En utilisant un autre modèle d'étude avec notamment des vecteurs rétroviraux BCR-ABL porteurs de T315I, il a été montré que la transduction des EB de CSE murines conféraient à ces cellules la possibilité de reconstitution de l'hématopoïèse à long terme maintenue lors des greffes sériées (Melkus et al., 2013). Avec la découverte de la technologie iPSC, il est devenu possible de reprogrammer des cellules primaires de patients atteints de LMC.

d) Modèles de cellules souches pluripotentes de LMC

En 2010 il a été montré qu'il était possible de reprogrammer des cellules leucémiques porteuses du chromosome Philadelphie. En effet, l'équipe de Carette a induit à la pluripotence la lignée KBM7 avec un rétrovirus OSMK (Carette et al., 2010). Cette première étude a montré la possibilité de redifférencier ces cellules en cellules CD34+ et a surtout permis d'obtenir la preuve de concept de la faisabilité de la reprogrammation des cellules Ph1+ (Carette et al., 2010). K. Hu et I. Slukvin produisent un an plus tard une lignée iPSC dérivée de cellules mononuclées de moelle osseuse de patients atteints de LMC, cette reprogrammation étant réalisée avec un vecteur épisomal non-intégratif (Hu et al., 2011). Les iPSC spécifiques de patients doivent certes permettre le développement d'un phénotype leucémique *in vitro* pour que leur intérêt soit démontré.

Cette étude montrait que la lignée iPSC porteuse du chromosome Ph1, était également capable de se redifférencier en cellules hématopoïétiques (différenciation sur OP9) avec une meilleure efficacité qu'une lignée iPSC dérivée de fibroblastes. L'iPSC générait ainsi des cellules CD34⁺ CD43⁺ (progéniteurs hématopoïétiques), et parmi ces cellules, on distinguait une population de cellules érythro-mégacaryocytaires et une population de progéniteurs multipotents. Ces progéniteurs hématopoïétiques produisaient des colonies hématopoïétiques de type CFU-GM, BFU-E et (CFU-GEMM) (Hu et al., 2011).

Dans une autre étude, l'équipe de K. Kumano (Kumano et al., 2012, 2013) a rapporté la génération d'une lignée iPSC à partir de cellules mononuclées CD34⁺ de moelle osseuse de patients atteints de LMC. La lignée a été reprogrammée avec des particules rétrovirales, un pseudo-type VSV-G codant les 4 facteurs de pluripotence de S.Yamanaka. Ils ont étudié le profil de méthylation de leur lignée et ont montré que son méthylome était proche de celui des iPSC normales mais différentes de celui des cellules du patient au diagnostic. Le promoteur de gènes spécifiques au lignage hématopoïétique comme CD45 et CD11b était hyperméthylé dans les iPSC.

Un travail plus récent a rapporté la génération d'une lignée iPSC à partir de CD34⁺ de sang périphérique d'un patient en phase chronique de la maladie et en RMM (rémission moléculaire majeure) après 6 mois sous IM. Les cellules leucémiques ont été reprogrammées avec un vecteur lentiviral floxé (site LoxP) excisable avec une Cre recombinase (Bedel et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs ont étudié la survie des iPSC en présence de différentes concentrations d'IM et la sensibilité des cellules hématopoïétiques dérivées de ces iPSC (différenciation sur OP9) dans les tests clonogéniques. Ils ont ainsi observé une absence de toxicité des iTK sur les iPSC évaluée par le nombre de colonies après marquage à la phosphatase alcaline.

Dans cette étude, Les iTK entraînaient une diminution de l'expression de phospho-CrkL donc de manière indirecte de l'activité kinase de BCR-ABL (Bedel et al., 2013). Cependant, après différenciation hématopoïétique, les auteurs n'ont pas observé de phénomène de myéloprolifération mais la sensibilité aux iTK était partiellement rétablie.

Enfin une autre étude plus récente, a permis de montrer qu'il était possible d'utiliser un modèle d'iPSC de LMC pour la découverte d'un facteur de survie des CSH leucémiques (Suknuntha et al., 2015).

En résumé, les modèles de cellules souches pluripotentes de LMC actuellement décrits ne permettent pas la reproduction des caractéristiques essentielles de la maladie et en particulier aucun modèle n'a permis de montrer la faisabilité de l'induction d'une hématopoïèse à long-terme. Dans le chapitre suivant, nous étudions la technologie des iPSC et l'hématopoïèse primitive dérivées de ces cellules.

Chapitre 2 : Cellules souches pluripotentes et mécanismes de la reprogrammation

1. Contexte historique

Il existe chez l'adulte différents types de cellules souches, classées selon l'étendue de leurs potentiels de différenciation. La cellule souche totipotente que constitue le zygote a la capacité de générer un organisme entier. Les cellules souches pluripotentes issues du zygote sont capables de produire tous les tissus de l'organisme. Les cellules souches multipotentes de l'embryon au-delà de 10 jours de gestation perdent leurs pluripotences et se restreignent à un tissu ou groupe de tissus spécifiques générant des cellules souches spécifiques de tissus. Les cellules souches ont donc diverses origines, cela explique la variabilité de leurs propriétés biologiques.

Les connaissances obtenues dans les CSE murines ont permis, dès 1998, de générer des CSE humaines (Thomson et al., 1998) ayant la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier vers tous les tissus de l'organisme (Evans et Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998). Cette découverte a ouvert des perspectives majeures de thérapie cellulaire et plus de 200 lignées de cellules ES humaines ont été générées en moins de 10 ans.

Malgré les perspectives thérapeutiques (développées dans la partie 4) qu'elle suscite, cette avancée pose des problèmes éthiques justifiant en France la mise en place d'une loi bioéthique (loi de bioéthique 2004 revue en 2011 et 2013) nécessitant une autorisation d'importation et de recherche délivrée par l'agence de biomédecine (Loi n° 2013-715). L'utilisation thérapeutique des ES humaines est actuellement devenue une réalité avec notamment en France, la mise en place d'un essai de transplantation de cardiomyocytes dérivés des ES (Burt et al., 2012; Menasché and Vanneaux, 2016).

En étudiant la possibilité de générer une cellule souche pluripotente équivalente à une cellule ES in vitro, Shinya Yamanaka et Kazutoshi Takahashi ont montré chez la souris (en 2006) puis chez l'homme (en 2007) la possibilité de générer des cellules pluripotentes à partir de cellules somatiques issues d'un organisme adulte par une reprogrammation génétique conduisant ainsi à la mise en place de la technologie des cellules souches pluripotentes induites (iPSC), l'une des découvertes majeures en biologie et médecine (prix Nobel 2012) (149–151).

Auparavant, ce sont les travaux de John Gurdon (prix Nobel de physiologie 2012) qui avaient permis une première avancée vers la compréhension du mécanisme de reprogrammation grâce au transfert nucléaire chez le xénope en 1962, suivies par Ian Wilmut chez le mammifère une trentaine d'année plus tard. Il montrait ainsi qu'il était possible de générer une grenouille vivante après transfert d'un noyau de cellule intestinale adulte dans un ovocyte énucléé d'une autre grenouille. Cette découverte démontrait ainsi que le noyau d'une cellule somatique était équivalente à celui du zygote et que le cytoplasme de l'ovocyte contenait les éléments nécessaires à la reprogrammation (Gurdon, 1962; Wilmut, 1996).

2. Mécanismes de reprogrammation

a) Facteurs de pluripotence

Dans les travaux de Takahasi et Yamanaka, une étude de transcriptome avait permis de générer une signature de pluripotence des cellules ES (Takahashi et al., 2007). Parmi ces facteurs, 24 facteurs de transcription candidats ont été sélectionnés pour leur fonction de maintenance de l'autorenouvellement ou de la pluripotence dans l'embryon et les cellules souches embryonnaires (ESC).

C'est en surexprimant simultanément ces 24 facteurs de transcriptions dans des fibroblastes murins qu'il a été possible d'identifier 4 facteurs exogènes suffisants et nécessaires pour l'obtention de colonies pluripotentes : OCT4, SOX2, KLF4 et cMYC (communément appelé OSKM ou facteurs de Yamanaka) (Takahashi and Yamanaka, 2006) dont 2 limitants permettant l'acquisition du caractère pluripotent OCT4 et SOX2.

A la suite de ces résultats, plusieurs équipes vont parvenir à reprogrammer des cellules somatiques murines et humaines de fibroblastes (Lowry et al., 2008), PBMC (Haase et al., 2009), neurones (Kim et al., 2011) ou encore kératinocytes (Aasen et al., 2008).

La communauté scientifique partage des objectifs communs : rendre la reprogrammation reproductible, augmenter son rendement et sécuriser la technique pour la thérapie cellulaire. L'étude des mécanismes de la reprogrammation permet donc d'adapter les facteurs initialement décrits et de les substituer par d'autres tels qu'Esrrb (Feng et al., 2009) et E-cadherine (Redmer et al., 2011) chez la souris, NANOG chez l'Homme (Yu et al., 2007) et Glis1 (Maekawa et al., 2011), shp53 (Hanna et al., 2009), Lin28 (Hanna et al., 2009), UTX (Mansour et al., 2012) fonctionnels pour les deux espèces. La combinaison initiale OSKM reste toujours majoritairement utilisée.

b) Mécanismes de la reprogrammation

La reprogrammation est un processus en 3 étapes : initiation, maturation et stabilisation. Elle implique un remaniement phénotypique, métabolique, génomique et épigénomique de la cellule somatique (Hawkins et al., 2014).

L'étape d'initiation débute avec la méthylation des gènes somatiques après l'expression ectopique des transgènes. Elle est caractérisée par l'observation de phénomènes successifs suivants : une augmentation de la prolifération, la réactivation de l'activité de la télomérase, l'induction d'une transition mésenchymo-épithéliale (MET) et un switch métabolique (Hawkins et al., 2014).

L'augmentation de la prolifération a été observée 3 jours après l'initiation de la reprogrammation. Elle est initiée par c-Myc, Shp53 ou Lin28. Ce dernier est un régulateur du cycle cellulaire, il module les cyclines A et B ainsi que Cdk4 tandis que p53 induit l'arrêt du cycle via p21.

La MET est caractérisée par la polarisation des cellules et l'expression de molécules d'adhésion telle que la E-cadhérine. L'induction et le maintien de MET est une étape indispensable à l'initiation de la reprogrammation. En effet, il a été montré que la réversion du processus de MET vers une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) était associée à un échec de l'étape d'initiation (Eastham et al., 2007). L'importance de ce mécanisme justifie les fonctions complémentaires des facteurs de pluripotence Sox2 et Klf4. Sox2 inhibe l'expression de Snail qui est un inducteur d'EMT et Klf4 promeut la MET via l'expression de la E-cadhérine. Deux voies de signalisations convergentes peuvent être également ciblées pour leurs rôles dans l'EMT ou l'induction du mésoderme: la voie du TGF β et la voie MAPK. L'emploi d'inhibiteurs de ces voies permettrait de stimuler l'étape d'initiation ainsi que l'expression de Nanog (Hawkins et al., 2014).

7 jours après transfert lentiviral des gènes de pluripotence, un switch métabolique se produit. La cellule passe d'un système énergétique par phosphorylation oxydative vers une glycolyse anaérobie. Ce switch également utilisé par les cellules cancéreuses implique la voie Pi3K/Akt (Hawkins et al., 2014).

L'étape de maturation dure plus ou moins longtemps selon les protocoles utilisés. Chez l'Homme, Lin28 est l'acteur principal de cette étape (Tanabe et al., 2013). Elle est caractérisée par l'expression des gènes endogènes associés à la pluripotence tels que Fbxo15, Sall4, Esrrb, Oct4 et Nanog.

Chez la souris, ce sont les voies LIF/STAT3 et Wnt qui assurent le bon déroulement de cette étape. La voie LIF/STAT3 induit la déméthylation du promoteur des gènes associés à la pluripotence. Le facteur de transcription STAT3 bloque l'activation de la DNA méthyltransférase DNMT1 et les histones déacétylases 2, 3 et 8. En ce qui concerne la voie Wnt, il a été montré qu'elle stimulait la reprogrammation des cellules exprimant Nanog (Hawkins et al., 2014).

Seulement 1% des cellules initiées parviennent à l'étape de stabilisation. Elle requiert impérativement la suppression des transgènes. Ainsi, seules les cellules ayant activées les gènes de pluripotence endogènes peuvent aboutir à l'état pluripotent. Des inhibiteurs de DNA et histone méthyltransférases peuvent être employés pour favoriser cette étape.

Chez la souris, la réactivation du chromosome X est également indispensable et implique les voies LIF et BMP4.

A la suite de ces trois étapes de reprogrammation (**figure 16**), il est possible de distinguer deux états de pluripotence : l'état naïf pour les IPS murines dépendantes du LIF et du BMP4 ainsi que l'état amorcé pour les iPSC humaines moins clonogéniques (moins potentes) que les cellules ES et dépendantes du FGF2 ou de la voie Activin/Nodal (Hawkins et al., 2014).

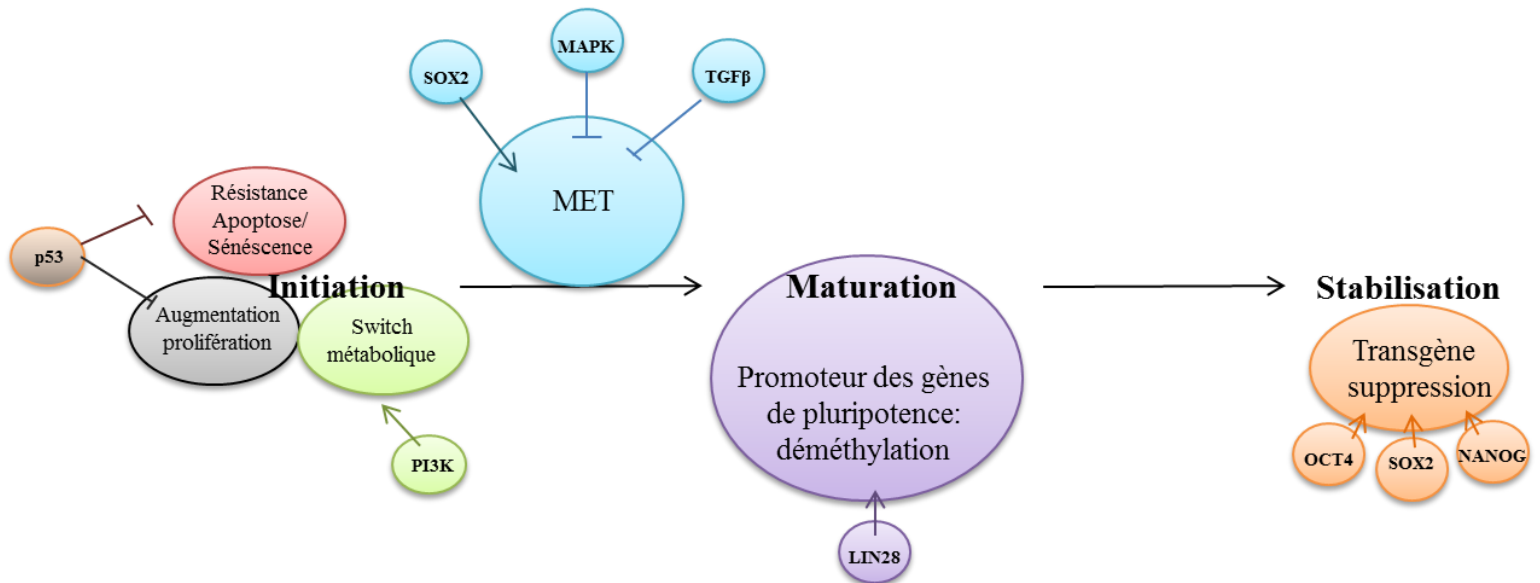


Figure 16 : Représentation des 3 étapes de la reprogrammation des CSE chez l'homme (adapté de (Hawkins et al., 2014))

c) Techniques de reprogrammation : avantages et inconvénients

Différentes techniques de reprogrammation ont été développées et chacune fonctionne de manière stochastique sur les cellules cibles. L'efficacité de la reprogrammation varie selon la technique employée, l'espèce et le tissu d'origine. Cette variabilité est déterminée par la quantité de cellules somatiques initialement transfectées, le pourcentage et la morphologie des colonies IPS qui expriment la GFP (Li et al., 2014).

Il est possible de classer les techniques de reprogrammation en deux groupes : approches intégratives et non-intégratives. Ces groupes comprennent différents types de vecteurs : virus, ADN, ARN ou peptides.

Les premières lignées IPS ont été générées par transduction virale (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Cette approche entraînait des intégrations dans le génome. L'intégration au génome et le nombre de copie de chaque transgène sont en effet des facteurs déterminants du potentiel tumorigène d'une IPS, notamment pour les cocktails s'appuyant sur la surexpression du proto-oncogène c-Myc (Okita et al., 2007). De ce fait, des techniques alternatives ont dû être développées.

L'équipe de Jaenisch propose l'utilisation de vecteurs lentiviraux intégratifs excisables. Ce système est inducible via doxycycline et assure le retrait des transgènes de leurs sites d'intégrations (Hockemeyer et al., 2008). Cette technique est cependant peu efficace due à la faible intégration de l'enzyme dans les iPSC et la faible sensibilité des techniques de suivi. Le procédé est amélioré en remplaçant le système Cre-Lox par un vecteur polycistronique couplé à un gène rapporteur. Le suivi de l'excision des vecteurs se fait ainsi en temps réel (Sommer et al., 2009).

Le système PB transposon utilise les propriétés d'excision et de relocalisation des transposons à différents sites du génome. Ce système nécessite une transposase pour permettre la catalyse des sites d'insertions (Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009)

Afin d'assurer la sûreté notamment pour éviter la tumorigénicité des iPSC, des techniques de transfection non intégratives ont été développées. Les adénovirus permettent la surexpression transitoire de facteurs exogènes. En 2008, Stadfeld et collaborateurs sont les premiers à produire à partir de fibroblastes murins une lignée iPSC dérivée en utilisant cette technique (Stadfeld et al., 2008). Il montre cependant qu'environ 23% des lignées sont tétraploïdes contrairement aux IPS produites avec des rétrovirus ou lentivirus.

La méthode non intégrative la plus optimale est celle du virus de Sendai (SeV) (**figure 17**) (Fusaki et al., 2009). Ce virus murin est apparenté au virus du Parainfluenzae humain. C'est un virus à ARN monocaténaire à réplication cytoplasmique. Son expression diminue avec les divisions cellulaires. Il peut être complètement éliminé grâce à un tri phénotypique spécifique des cellules infectées avec un anticorps dirigé contre la glycoprotéine de surface HN (Fusaki et al., 2009).

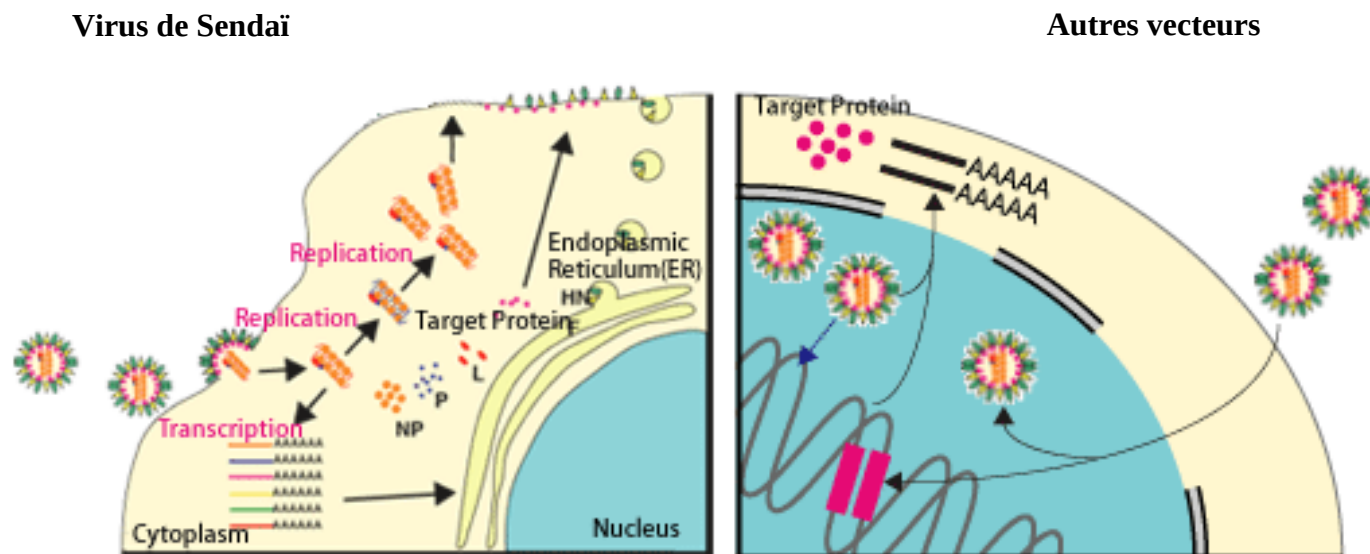


Figure 17 : Mécanisme d'action de la reprogrammation par SeV. Le virus de Sendai reconnaît les récepteurs à groupement acide sialique à la surface de la membrane plasmique (mp) de la cellule cible via la protéine HN exprimée à la surface de l'enveloppe HVJ (Hemagglutinating virus of Japan). La protéine F (autre protéine de l'enveloppe) induit la fusion avec la mp et permet la libération dans le cytoplasme de la molécule à transférer jusqu'alors intégré à l'ARN génomique du virus. Les autres types de vecteurs s'intègrent à l'ADN de la cellule cible.

D'autres techniques font usage de virus de type Epstein-Barr (Yu et al., 2009), d'ARN messagers synthétiques (Warren et al., 2010; Yakubov et al., 2010), des microARN (Anokye-Danso et al., 2011) ou encore de protéines recombinantes (Pan et al., 2010). Malgré ce large choix de techniques de reprogrammation, les approches intégratives restent peu recommandées en raison du risque de tumorigénicité et la sensibilité de chaque technique reste un souci majeur.

3. Caractérisation des cellules souches pluripotentes

La pluripotence est une caractéristique définie par la capacité de générer tous les lignages cellulaires issus des sites intraembryonnaires produits au cours du développement. Pour valider cet état de pluripotence, les cellules embryonnaires humaines et les cellules souches pluripotentes induites sont soumises à un contrôle qualité contraignant et régulier.

a) Marqueurs caractéristiques

Les cellules souches pluripotentes prolifèrent rapidement due à une phase G1 du cycle cellulaire plus courte et se structurent en colonies tridimensionnelles (Becker et al., 2006). Leur maintien et leur prolifération sont facilités par une sous-couche de cellules nourricières constituées de fibroblaste d'embryon de souris (MEF) (Tremml et al., 2008).

Les marqueurs de surfaces SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 et TRA-1-81 sont les antigènes le plus communément utilisés pour estimer phénotypiquement le degré de pluripotence d'une lignée.

Le niveau d'expression de la télomérase et l'activité de la phosphatase alcaline sont également de bons éléments de caractérisation.

En complément de caractérisation, l'expression des gènes endogènes de pluripotence peut être contrôlée par immunofluorescence ou RT-PCR. Enfin, le caryotype de chaque lignée doit être effectué régulièrement au cours des passages pour s'assurer du maintien de l'intégrité de la lignée (Smith et al., 2009).

b) Potentiel de différenciation

Le standard pour valider la pluripotence d'une lignée humaine est la formation de tératome *in vivo* et de corps embryonnaires *in vitro* (**figure 18** adapté de (Grskovic et al., 2011)) (Smith et al., 2009).

Le tératome est un ensemble de tumeurs embryonnaires différenciées provenant des trois feuillets (ectoderme, endoderme et mésoderme) après xénogreffe sous cutanée de cellules souches pluripotentes à des souris immunodéficientes. Les tissus produits dans ce tératome sont généralement normaux mais il peut y avoir des formes malignes appelées tératocarcinomes. Elles contiennent parmi les tissus normaux, des cellules indifférenciées à caractères souches.

In vitro, les corps embryonnaires sont des structures en trois dimensions dites cystiques ou pleines, reconstituant les trois feuillets embryonnaires. Elles se forment après agrégation des cellules souches pluripotentes en condition de culture non adhérente ou semi-solide.

4. Perspectives thérapeutiques : modélisation de pathologies

La technologie des iPSC représente une avancée majeure non seulement en biologie mais aussi dans tous les domaines de la médecine. Cette rupture technologique a ainsi permis d'invalider le dogme de l'irréversibilité de l'état différencié dans les cellules somatiques. Elle a ensuite permis d'envisager des approches de médecine personnalisée avec notamment le développement de tests de toxicité, de criblage de nouveaux médicaments et de modélisation de pathologies humaines (**figure 18**).

Enfin, cette technologie offre des perspectives de thérapie cellulaire inédites, avec notamment la possibilité de régénérer des tissus et peut être des organes.

Ces approches ne seront possibles que lorsque certains obstacles seront franchis. En effet, les iPSC peuvent acquérir spontanément des anomalies du génotype au cours des passages tels que des aneuploïdies, des translocations, des mutations, des duplications ou encore des délétions (Amps et al., 2011; Taapken et al., 2011). Ces anomalies sont induites par des mutations acquises au niveau de gènes impliqués dans l'oncogenèse. Le deuxième obstacle à franchir est la nécessité de développer des techniques de différenciation robustes, ce qui n'est pas actuellement le cas pour les différents types cellulaires.

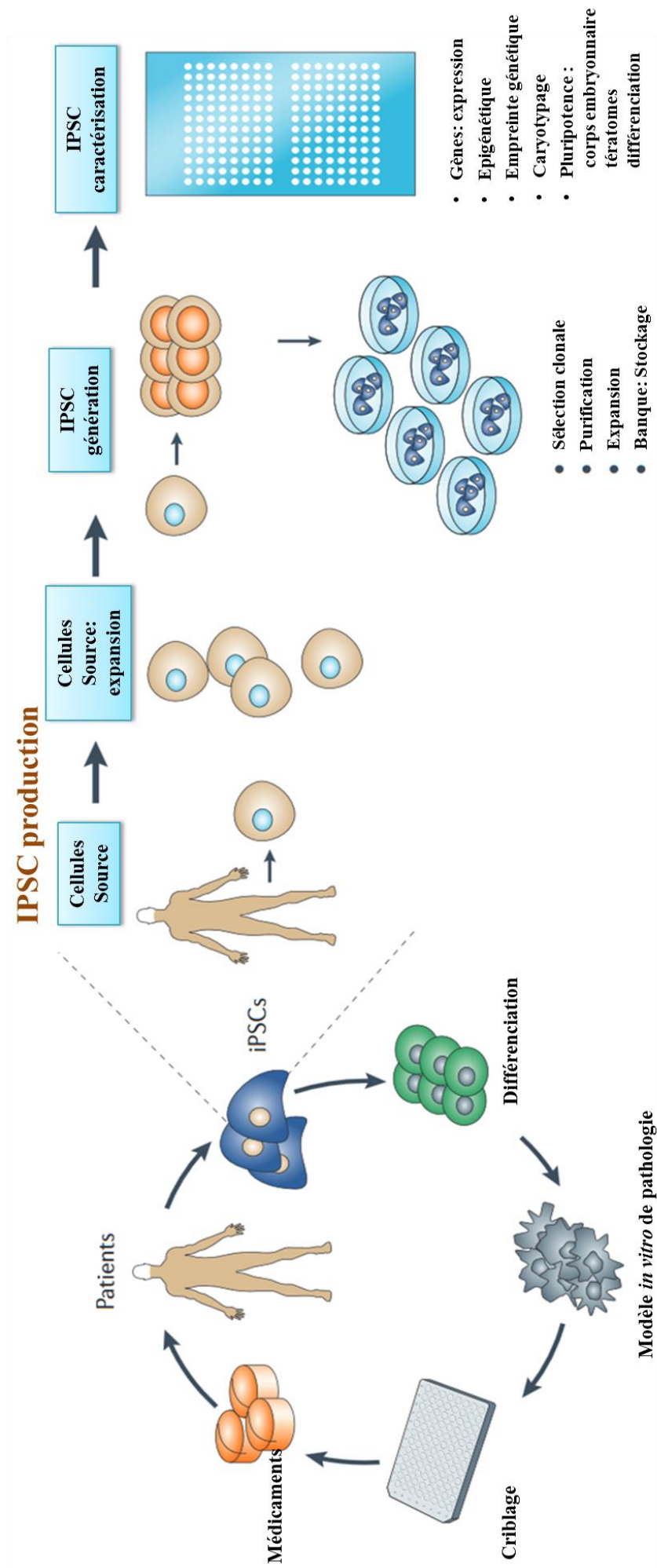


Figure 18: Modèle de plateforme d'IPSC. Développement de l'IPSC, étapes de validations et perspectives thérapeutiques.

Chapitre 3 : IPSC et différenciation hématopoïétique

La différenciation hématopoïétique à partir des cellules souches pluripotentes permet de récapituler une partie de l'hématopoïèse du développement embryonnaire et fœtal. Dans le système embryonnaire il existe deux programmes distincts impliqués dans l'émergence des cellules hématopoïétiques : l'hématopoïèse primitive et l'hématopoïèse définitive, seule cette dernière étant présente et fonctionnelle à l'âge adulte.

1. Hématopoïèse primitive

a) Hémangioblaste : sites d'émergence et potentiels

L'hématopoïèse primitive dérive du mésoderme et prend place dans le sac vitellin. Elle est caractérisée par la production d'érythroblastes primitifs nucléés et de grande taille, suivi de macrophages et de mégacaryocytes primitifs (Palis et al., 2010). Les cellules myéloïdes primitives générées par le sac vitellin seraient à l'origine des cellules microgliales du cerveau, du pool de cellules de Langerhans et des cellules Kupffer du foie. Les cellules hématopoïétiques primitives émergeraient d'un progéniteur bi ou tripotent appelé hémangioblaste (Choi, 2002). Ce progéniteur dont la présence chez l'adulte est toujours très controversée, aurait la capacité de générer à la fois des cellules hématopoïétiques et des cellules endothéliales mais également des cellules du muscle lisse et cardiaque chez la souris (Huber, 2004).

Le concept d'hémangioblastes a émergé suite aux travaux de His, Sabin et Murray au début du XXème siècle (His, 1900; Murray, 1932; Sabin, 1920). Au cours de la formation des îlots sanguins, ces auteurs ont pu observer sur des explants d'embryon de poulet, l'émergence de cellules sanguines à partir des cellules endothéliales de la paroi. Ils en ont donc conclu qu'un progéniteur commun pourrait être à l'origine des deux lignages.

L'hypothèse sera validée tout d'abord *ex-vivo* par des explants de sac vitellin (Moore and Metcalf, 1970) et avec les cellules FLK1⁺ d'embryons de poulet (Eichmann, 1993) puis *in vitro* à partir du modèle de cellules ES murines (Choi, 1998; Nishikawa et al., 1998). Ils démontrent le potentiel que possède une cellule du mésoderme à produire une cellule endothéliale ou une cellule hématopoïétique. Il faudra attendre les années 2006-2007 pour une validation *in vitro* dans les cellules humaines (Kennedy et al., 2007; Lu et al., 2007).

La caractérisation *in vivo* du potentiel d'un hémangioblaste au cours de la gastrulation a été réalisée chez l'embryon de souris en 2004 (Huber, 2004), chez le zébrafish en 2006 (Vogeli, 2006) puis chez la drosophile (Mandal, 2004) et chez l'Homme (Oberlin, 2002).

La contribution de l'hématopoïèse primitive à l'hématopoïèse adulte reste encore peu claire et controversée. Pour certains, l'hémangioblaste ne permet pas le soutien d'une hématopoïèse à long terme comme le montre le modèle de chimère cailles-poulet et pour d'autres, une faible proportion contribuerait à l'hématopoïèse définitive et aux CSH (Costa et al., 2012). L'hématopoïèse du sac vitellin serait capable de générer chez la souris des précurseurs lymphoïdes B, marqueurs de l'émergence de CSH (Yoshimoto et al., 2011).

b) Différenciation *in vitro* à partir du modèle ES et IPS

On nomme BL-CFC (Blast Colony forming cell) ou colonie blastique, une population hémangioblastique clonale *in vitro* (Kaufman et al., 2001). Elle dérive d'un stade intermédiaire de corps embryonnaires précoces orienté vers le mésoderme. Il a été démontré par Choi chez la souris (Choi, 1998) et Lu chez l'Homme (Lu et al., 2007) que cette population présentait un potentiel de différenciation à la fois hématopoïétique et endothéliale. La population de BL-CFC est composée de petites cellules pouvant à la fois former des colonies de types serré (tight colony) ou plus éparées et contenant des progéniteurs plus engagés que d'autres vers le lignage hématopoïétique avec l'expression de l'intégrine α IIb (CD41a) puis de la leukosialine (CD43).

La différenciation et la caractérisation des BL-CFCs mettent en évidence le caractère transitoire de ce progéniteur (Kennedy et al., 2007; Metcalf, 2010) et selon l'étude de Qiang Feng, les BL-CFC humaines auraient un potentiel de prolifération limité et entreraient précocement en sénescence (Feng et al., 2010). L'injection des BL-CFCs *in vivo* dans des modèles de rats diabétiques ou d'ischémie reperfusion de la rétine chez la souris a montré qu'elles possédaient le potentiel de coloniser la région endommagée et participer à la réparation des vaisseaux (Lu et al., 2007). Le potentiel de reconstitution hématopoïétique à long terme de cette population n'a pas encore pu être démontré *in vivo*.

Une autre méthode pour générer un précurseur hémangio/hématopoïétique à partir des cellules ES ou IPS passe par la production de corps embryonnaires tardifs. Ces structures 3D sont schématiquement des reproductions des 3 feuillets embryonnaires issus de l'agrégation des colonies de cellules pluripotentes. On pourra retrouver au sein de ces structures hétérogènes un contingent de cellules exprimant les mêmes marqueurs de surfaces hémangioblastiques.

c) Phénotypes des cellules hémangioblastiques

Il n'existe pas de marqueurs exclusifs de l'hémangioblaste, mise à part probablement le marqueur BB9 (CD143). Ce dernier fait partie du système rénine-angiotensine qui joue un rôle central dans l'engagement vers le lignage hématopoïétique ou endothélial de l'hémangioblaste respectivement via les récepteurs angiotensine II de type 2 et 1 (Cao and Yao, 2011).

L'expression du récepteur 2 du VEGF (FLK1, VEGFR2, CD309 ou encore KDR) est également un marqueur majeur de l'hémangioblaste. Il est indispensable à la formation des îlots sanguins et son invalidation inhibe l'émergence des hémangioblastes du sac vitellin.

Le contingent hémangioblastique se définira donc par un ensemble de biomarqueurs appartenant aux lignages hématopoïétique et/ou endothéliale comme le CD31, le CD34, la VE-cadhérine (CD144), le VEGFR2, le BB9 ou encore le CD41 et le CD43 (Cao and Yao, 2011).

d) Programme transcriptionnel du développement hémangioblastique et de l'hématopoïèse primitive (Jagannathan-Bogdan and Zon, 2013; Slukvin, 2013; Xiong, 2008)

Le modèle poisson-zèbre ainsi que l'élaboration des protocoles de différenciation des BL-CFCs chez la souris et l'Homme ont permis une avancée sur la compréhension des facteurs impliqués dans le développement de l'hémangioblaste.

Le poisson-zèbre est un modèle de développement embryonnaire efficient. Il atteint sa maturité au bout de 3 mois, produit un grand nombre d'embryons et possède un programme hématopoïétique conservé avec les mammifères. Le mutant *Cloche* par exemple présente des défauts de développement au stade précoce de la différenciation endothéliale et hématopoïétique. Il inhibe complètement l'expression des gènes *Tal1*, *Lmo2*, *Gata1*, *Mpo* et *Flk1*. Le gène *Cloche* serait donc important pour la spécification hémangioblastique. Le mutant *vlad tepes* qui est un mutant *Gata1*, a permis de montrer son importance dans l'érythropoïèse primitive. L'invalidation du gène *Gata1* bloque la différenciation des proérythroblastes en érythrocytes matures et entraîne un switch myéloïde. Il agit en effet en opposition à Pu.1 (Ets) et constitue une balance pour la régulation de la différenciation érythro/myéloïde.

Les différents modèles d'étude auront mis en évidence la coexpression de différents gènes comme *Tal1*, *Gata2*, *Lmo2*, *Scl*, *Mixl1*, *Hhex*, *Smad1-2* et *Etsrp* (*Etv2*) qui codent pour des protéines importantes pour le développement hémangioblastique et de l'hématopoïèse, comme cela a été démontré par des expériences d'invalidation.

Par exemple, Gata2 joue un rôle majeur dans l'autorenouvellement et la prolifération des progéniteurs. Les souris Gata2^{-/-} meurent dès le stade embryonnaire dû à une anémie sévère. L'inactivation de Tal1 induit une perte d'érythropoïèse et de myélopoïèse primitive ainsi qu'une perturbation du développement endothélial. Lmo2 agit en parallèle de Tal1 et Gata2. L'inactivation de Lmo2 entraîne une perte d'érythropoïèse du sac vitellin. Lmo2 est également un partenaire de Scl. Dans les embryons de souris et dans les corps embryonnaires dérivés des cellules pluripotentes, il ne serait pas indispensable à l'induction du mésoderme et de l'hémangioblaste. L'inactivation de Scl conduit à une production de colonies blastiques sans potentiel hématopoïétique et les embryons de souris Scl^{-/-} ont une perte totale d'hématopoïèse.

e) Homéostasie de l'hémangioblaste

Les deux facteurs essentiels à la production de BL-CFC sont le VEGF et le BMP4.

Le VEGF a une action paracrine et est sécrété par les cellules de l'endoderme au cours du développement embryonnaire. Son récepteur tyrosine kinase est exprimé au niveau des cellules du mésoderme (angioblaste et cellules endothéliales). Les souris mutantes Vegf, Flk1 et phospholipase C-gamma 1 (Plcg1) présentent une diminution des progéniteurs hémangioblastiques.

Le BMP4 a pour cible directe l'expression de Gata2 et ainsi promeut l'expression de Flk1, Scl et de sa propre expression par les cellules hémangioblastiques (Lugus et al., 2007). Il est nécessaire à l'induction de l'hématopoïèse primitive par les cellules souches embryonnaires (Kennedy et al., 2007). BMP4 agirait en synergie avec Wnt3a, un ligand de la voie Wnt/ β cat pour stimuler la production de BL-CFCs en induisant le mésoderme et en potentialisant la taille des corps embryonnaires (Gertow et al., 2013). La signalisation induite par BMP4 et Wnt3a induirait les gènes Hox et Cdx1-4 via LEF1 effecteur de la voie Wnt dans les ES murines et le poisson-zèbre (Lengerke et al., 2008).

D'autres facteurs hématopoïétiques vont permettre de stimuler la production de BL-CFC comme le SCF, le TPO, le FLT3L, l'EPO et le bFGF (Faloon et al., 2000) mais on ignore toujours les facteurs responsables de la prolifération et la survie des colonies blastiques *in vitro*.

Actuellement, les techniques d'amplification des BL-CFC sans induction de différenciation ne sont pas connues.

2. Hématopoïèse définitive

L'hématopoïèse définitive se caractérise tout d'abord par l'apparition de progéniteurs érythroïdes et myéloïdes suivis de celle des cellules souches hématopoïétiques possédant un potentiel de reconstitution à long-terme. Dans l'embryon de souris, l'hématopoïèse définitive apparaît au stade E10.5. Les cellules produites migrent et colonisent le foie fœtal au stade E11-E12 puis la moelle osseuse au stade E16.5 formant ainsi le pool de CSH.

Les travaux de Dieterlen-Lièvre sur les chimères cailles-poulet ont permis de démontrer que le système hématopoïétique à long terme était constitué de cellules provenant de sites intra-embryonnaires et non de site extra-embryonnaire (Dieterlen-Lièvre, 1984). Cela dit le pool de cellules colonisatrices du foie fœtal est important et ne peut être pourvu uniquement par les sites intra-embryonnaires. Cette assertion vient soutenir les hypothèses selon lesquelles le sac vitellin (Kyba et al., 2002), le placenta (Dzierzak and Robin, 2010) ou encore l'endocarde (Nakano et al., 2013) pourraient participer à la production des CSH adultes.

a) Endothélium Hémogénique : sites d'émergence et potentiel

Les cellules souches hématopoïétiques à l'origine de l'hématopoïèse adulte sont issues du programme définitif à partir d'une population d'endothélium vasculaire spécialisée nommée endothélium hémogénique (Dzierzak and Speck, 2008). Chez l'homme, l'endothélium hémogénique émerge au niveau de sites de développement des vaisseaux sanguins tels que la splanchnopleure paraaortique et la région de l'aorte-gonade-mésonephros (AGM), située au niveau du planché de l'aorte dorsal. Tavian en 1996 chez l'homme (Tavian et al., 1996) ainsi que Dieterlen-Lièvre et ses collaborateurs dans leurs modèles de chimères (Dieterlen-Lièvre, 1984), ont découvert des clusters de CSH et de progéniteurs au niveau de l'AGM avant la colonisation hépatique.

Des expériences de traçage *in vivo* dans l'embryon de souris et d'imagerie en temps réel chez le poisson-zèbre confirment ces observations (Gritz and Hirschi, 2016). L'endothélium hémogénique est également une population transitoire. Elle représenterait 1 à 3% des cellules endothéliales de l'AGM.

b) Phénotype de l'endothélium hémogénique

Tout comme l'hémangioblaste primitif, ces sites contiennent des progéniteurs coexprimant des marqueurs de surface endothéliaux et hématopoïétiques CD31, CD309, CD34, Ve-cadhérine (Labastie et al., 1998; Marshall et al., 1999; Oberlin, 2002; Tavian et al., 2001). La différence se fera au niveau du potentiel et du profil transcriptionnel. En termes de potentiel, seule la capacité de générer le lignage lymphoïde permet de déterminer le caractère souche hématopoïétique d'un progéniteur. Les cellules Ve-cadhérine⁺CD45⁻ coexprimant les marqueurs hémangioblastiques KDR, CD34 et CD31 auraient un potentiel lymphoïde à long terme après injection dans des souris irradiées (Gritz and Hirschi, 2016). *In vitro* cette population assure une hématopoïèse à long terme après co-culture sur un stroma médullaire (North et al., 2002; Oberlin, 2002; Tavian and Peault, 2005).

A partir des cellules souches pluripotentes humaines, on pourrait distinguer des cellules endothéliales de celles ayant un potentiel hémogénique par l'expression des marqueurs CD184 et CD73 (Ditadi et al., 2015) ou encore l'expression de l'intégrine $\alpha 4$. L'expression de leukosialine (CD43) et l'absence d'intégrine α IIb (CD41a)/Glycophorine a (CD235a) permettrait également d'identifier la population de progéniteurs multipotents (Slukvin, 2013).

c) Différenciation *in vitro* à partir du modèle ES et IPS

La génération de l'endothélium hémogénique à partir des cellules souches pluripotentes est réalisée en pratique sur cellules stromales de moelle osseuse murine de type OP9. Des cellules Ve-cadhérine⁺KDR⁺ émergent des colonies pluripotentes, puis elles se différencient en cellules de type endothélial avec des jonctions de types serrées Claudine 5⁺ pour enfin produire des cellules en suspension CD45⁺CD41⁺ (Vodyanik, 2005). En fonction du type de cellules, du type de stroma et des conditions de cultures, on observe une variabilité des marqueurs phénotypiques établis.

d) Profil transcriptionnel de l'endothélium hémogénique

Différents facteurs et voies de signalisations sont impliqués dans l'induction du potentiel hémogénique au niveau de l'endothélium vasculaire, en particulier l'acide rétinoïque (Yu et al., 2010), la voie Notch (Richard et al., 2013) et c-KIT (Marcelo et al., 2013).

L'acide rétinoïque (AR) régule la différenciation endothéliale et la spécification en endothélium hémogénique. Sa forme active l'ATRA (All Trans Retinoic Acid) est dérivée de la vitamine A (rétinol) par oxydation via la rétinaldéhyde déshydrogénase (RALDH1-3). Les souris KO pour la RALDH2 ont un développement vasculaire anormal par hyper prolifération des cellules endothéliales et une anémie causant la mort vers le stade E10 (Molotkov et al., 2005). Elles ont un défaut d'hématopoïèse définitive par perte du potentiel hémogénique de l'endothélium vasculaire. Les souris AR déficientes ont également une érythropoïèse hépatique fœtale fortement altérée et une perte du potentiel de production des CSH adultes (Dewamitta et al., 2014). Environ 90% des cellules endothéliales avec un phénotype hémogénique ont une signalisation via l'AR active (Chanda et al., 2013), ce qui témoigne du rôle majeur de l'AR et de la RALDH2 dans la spécification de l'endothélium hémogénique au cours de l'hématopoïèse définitive.

La voie Notch est une voie majeure de l'hématopoïèse. Elle influe sur l'engagement et la différenciation hématopoïétique. HES1, la cible de la voie Notch, connue pour réguler l'hématopoïèse, est stimulée par l'acide rétinoïque (Marcelo et al., 2013). De plus les embryons déficients pour un des récepteurs de la voie Notch (Notch 1 ou 4 et Jagged 1) vont développer un système vasculaire ou une hématopoïèse anormale (Gale et al., 2004; Robert-Moreno et al., 2008). Notch 1 est exprimé au niveau du planché de l'aorte. Le mutant *Notch1^{-/-}* entraîne au niveau de l'AGM une diminution de l'activité hématopoïétique tandis que sa surexpression produit l'effet inverse et conduit à l'expansion des cellules *Ve-cadhérine⁺* (Hadland et al., 2015). Le développement du lignage hématopoïétique nécessite généralement une balance entre la voie Notch et Wnt pour réguler les phases de différenciation et de prolifération. La voie Wnt serait requise transitoirement au niveau de l'AGM dans l'embryon murin pour l'émergence des CSH et la production des cellules hématopoïétiques à partir des précurseurs endothéliaux de l'AGM (Ruiz-Herguido et al., 2012). La voie est en effet activée dans l'AGM avec un fort taux de β caténine dans les cellules de l'aorte proche du site d'émergence des clusters hématopoïétiques.

C-KIT (CD117) est le récepteur du Stem Cell Facteur (SCF). Le SCF stimule le développement hématopoïétique (Marcelo et al., 2013) et les mutations c-KIT sont associées à une létalité causée par une forte anémie et une perte de développement des CSH (Waskow, 2004).

Une fois le potentiel hémogénique induit dans les cellules endothéliales vasculaires, elles effectuent une transition de type endothélio-hématopoïétique (TEH) sous le contrôle de gènes tels que RUNX1, HOXB4, SCL/TAL1, GATA2, GFI1b ou encore c-MYB et des conditions environnementales spécifiques (Gritz and Hirschi, 2016).

Runx1 est un régulateur hématopoïétique hautement exprimé par les cellules endothéliales hémogéniques. Sa délétion dans les cellules Ve-cadhérine⁺ CD41⁺ CD45⁻ conduit à une perte de formation des clusters hématopoïétiques CD41⁺ CD45⁺ de l'aorte. Les deux isoformes de RUNX1 1c et 1b sont des marqueurs du lignage hématopoïétique. RUNX1b est exprimé à un faible niveau dans l'endothélium hémogénique jusqu'au stade E10.5 et RUNX1c est initié uniquement au niveau des CSH. RUNX1 cible deux marqueurs majeurs de l'hématopoïèse définitive GFI1 et GFI1b.

Les membres de la famille HOX et SOX sont également acteurs de l'hématopoïèse définitive. Par exemple HOXA3 est important pour le développement endothélial. Il prévient la différenciation hématopoïétique des progéniteurs endothéliaux en réduisant l'expression de RUNX1, GATA1, GFI1B, IKAROS et PU.1. La diminution de son expression entraîne tout particulièrement la stimulation de l'expression de RUNX1 au niveau de l'endothélium de l'aorte. Dans les cellules ES murines, il maintient le phénotype endothélial. HOXA3 est donc un régulateur négatif de la TEH. HOXB4 en revanche conduit à la conversion en CSH adulte. Dans les progéniteurs hématopoïétiques dérivés des ES et des IPS, il cible les facteurs RUNX1, SCL, GATA2 et GFI1.

C-MYB est un proto-oncogène nucléaire. Il est exprimé dans l'endothélium hémogénique avant la TEH. Des mutants c-MYB chez la souris ont montré ses fonctions dans la maintenance, la différenciation des CSH et le développement lymphoïde. Le KO c-MYB est létal au stade E15.5 dû à une perte d'hématopoïèse du foie fœtal et une forte déficience en CSH au niveau de l'AGM. Cela confirme son rôle dans l'induction de la TEH et la migration ou la maintenance des CSH au niveau du foie fœtal.

Récemment, il a été découvert que le bourgeonnement des clusters hématopoïétiques de l'AGM se produit dans un environnement hypoxique. Le facteur HIF1 α jouerait donc un rôle dans la régulation de l'hématopoïèse et la génération des CSH de l'AGM. Enfin, la voie de l'inflammation TLR4/NF κ B régule également la TEH. Un faible signal pro-inflammatoire serait nécessaire à l'émergence des CSH.

PRÉSENTATION DES TRAVAUX

OBJECTIFS

Les objectifs des travaux présentés dans cette Thèse sont les suivants :

1-Génération et caractérisation des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) à partir des cellules primaires de leucémie myéloïde chronique (LMC).

2-Evaluation du potentiel de différenciation hématopoïétique des iPSC et caractérisation des cellules différenciées.

3- Evaluation de la faisabilité d'un modèle de progression blastique *in vitro* en utilisant une stratégie de mutagenèse.

RÉSULTATS

ARTICLE 1

Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with chronic myeloid leukemia (CML) resistant to targeted therapies

ARTICLE 1

Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with chronic myeloid leukemia (CML) resistant to targeted therapies

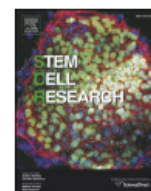
Dans la première partie de ces travaux nous décrivons la génération d'une lignée iPSC produite à partir des cellules leucémiques d'un patient âgé de 14 ans atteint de leucémie myéloïde chronique.

Ce patient a été traité initialement par Imatinib mesylate qui n'a pas permis l'obtention d'une rémission moléculaire après 18 mois de traitement. En 2005, une greffe allogénique a pu être pratiquée permettant la guérison du patient. Dans les cellules leucémiques du patient, aucune mutation du domaine ABL-kinase n'a pu être identifiée. Les cellules leucémiques cryopréservées au diagnostic ont été utilisées pour une reprogrammation en utilisant une stratégie non-intégrative avec un virus de Sendai exprimant les quatre facteurs de Yamanaka : OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC.

Les différents clones identifiés sur la base de critères morphologiques ont été poolés et amplifiés pour constituer la lignée polyclonale PB32 (Paul Brousse n°32). Trois clones ont également été amplifiés de manière indépendante : PB32-1, PB32-4 et PB32-5.

Les tests de pluripotence *in vitro*, réalisés sur la PB32, montrent l'expression de marqueurs de surfaces caractéristiques comme le SSEA-4 et le TRA-1-60 à plus de 90%.

La pluripotence de la lignée a ensuite été validée dans le modèle de souris immunodéficiente NOD/SCID/IL2R γ c (NSG). Nous avons injecté 2.10^6 cellules d'IPS PB32 par voie sous-cutanée et observé 2 mois plus tard la formation de tératomes. L'analyse des coupes histologiques des tératomes a révélé la formation de tissus non pathologiques différenciés issus des trois feuillets embryonnaires : endoderme, mésoderme ou ectoderme. Ces résultats témoignent du potentiel pluripotent de la lignée iPSC. Enfin, l'analyse cytogénétique a permis de confirmer que les cellules pluripotentes possédaient le chromosome Ph1. Cet outil cellulaire a pu ensuite être utilisé pour la suite de mon travail.



Lab Resource: Stem Cell Line

Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with chronic myeloid leukemia (CML) resistant to targeted therapies

G. Telliam^{a,b}, O. Féraud^{a,b,c}, F. Griscelli^{a,b,c}, P. Opolon^d, D. Divers^{a,b,c},
A. Bennaceur-Griscelli^{a,b,c,e}, A.G. Turhan^{a,b,c,e,*}

^a INSERM U935, Université Paris Sud, 94800 Villejuif, France

^b ESTeam Paris Sud, INSERM U935, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, 94800 Villejuif, France

^c INGEM National iPSC Infrastructure, 94800 Villejuif, France

^d Gustave Roussy, Laboratoire de Pathologie Expérimentale, F-94800 Villejuif, France

^e Division of Hematology, Paris Sud University hospitals, Le Kremlin Bicêtre 94275, Villejuif 94800, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2016

Received in revised form 23 July 2016

Accepted 2 August 2016

Available online 04 August 2016

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal malignancy initiated by the occurrence of a t(9;22) translocation, generating Ph1 chromosome and BCR-ABL oncogene in a primitive hematopoietic stem cell (HSC). The resistance of HSC to targeted therapies using tyrosine kinase inhibitors remains a major obstacle towards the cure. We have generated an iPSC line from a patient with CML using leukemic CD34+ cells cryopreserved at diagnosis. Ph1+ CML cells were reprogrammed by non-integrative viral transduction. These iPSCs harboured Ph1 chromosome and expressed pluripotency hallmarks as well as BCR-ABL. Teratoma assays revealed normal differentiation after injection in immunodeficient mice.

© 2016 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Resource table.

Name of stem cell lines	PB32: Polyclonal PB32 iPSC line and three clones 32-1, 32-4 and 32-5
Institution	INSERM U935 and INGEM, Université Paris Sud
Person who created resource	G. Telliam, O. Féraud
Contact person and email	Ali G Turhan: turviv33@gmail.com , abenna@hotmail.fr
Date archived/stock date	September 1, 2013
Origin	Leukemic CD34+ cells
Type of resource	Biological reagent: induced pluripotent stem cell (iPSC) generated by Sendai-virus mediated pluripotency gene transfer
Sub-type	Cell lines
Key transcription factors	Oct4, Sox2, cMyc, Klf4
Authentication	Identity and purity of cell line, expressing the same BCR-ABL transcript as the peripheral blood cells of the patient
Information in public databases	None
Ethics	The project was approved by INSERM Ethical Committee

Resource details

Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant myeloproliferative disorder originating from a primitive hematopoietic stem cell leading to an expansion of the progenitors and differentiated myeloid cells in the peripheral blood (Chomel and Turhan, 2011). Despite the major progress obtained in this disease by the use of tyrosine kinase inhibitors, the most primitive stem cells are resistant to these therapies (Jiang et al., 2007; Chomel et al., 2011). We have generated iPSC from the cryopreserved diagnostic sample of a patient according to his clinical response to Imatinib, the first clinically licensed tyrosine kinase inhibitor. This 14-year old young patient exhibited a clear resistance to this drug with absence of molecular response after 18 months of starting therapy. There was no mutation in the ABL-kinase domain of the BCR-ABL gene. In 2005, given his young age and the availability of a HLA-compatible sibling, an allogeneic stem cell transplant was performed with success. In 2016, he remains in good health in complete haematological and molecular remission. An induced pluripotent stem cell (iPSC) line were generated using cryopreserved CD34+ leukemic cells collected at diagnosis by non-integrative transduction of Oct3/4, Sox2, Klf4, and cMyc (Takahashi et al., 2007). iPSC colonies growing on MEF stromal layers were morphologically identified after 2–4 weeks (Fig. 1A), individually plucked as well as a polyclonal stock and expanded. Besides the polyclonal PB32 cell line, 3 clones (PB32-1, PB32-4 and PB32-5) were expanded. All have been characterized for their pluripotency. They exhibited typical markers of pluripotency such as expression of SSEA4

* Corresponding author at: INSERM U935, Université Paris Sud, 94800 Villejuif, France.
E-mail addresses: gladys.telliam@inserm.fr (G. Telliam), olivier.feraud@inserm.fr (O. Féraud), franck.griscelli@gustaveroussy.fr (F. Griscelli), paule.opolon@gmail.com (P. Opolon), dominique.divers@inserm.fr (D. Divers), abenna@hotmail.fr (A. Bennaceur-Griscelli), turviv33@gmail.com (A.G. Turhan).

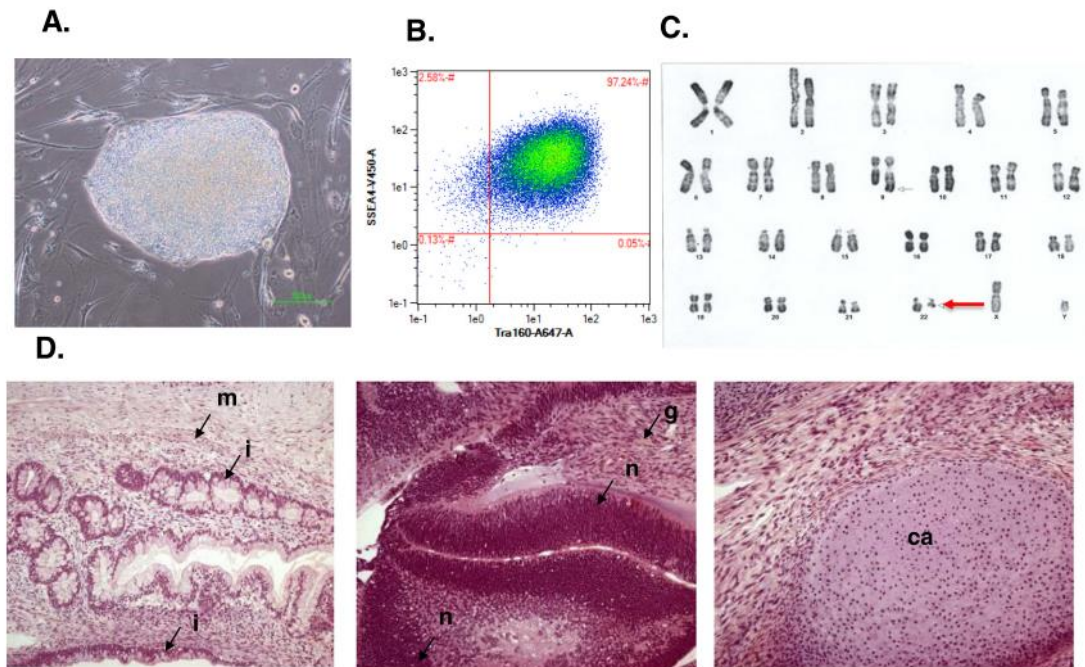


Fig. 1. Characterization of the PB32 Ph1-positive iPSC cell line. Panel A: Phase contrast imaging of PB32 colonies (polyclonal stock) grown on MEF stromal cells. Panel B: FACS evaluation of pluripotency markers using a double SSEA4 and TRA-1-60 staining confirming the presence of cell surface pluripotency markers on PB32 cells. Panel C: Cytogenetics analysis showing the presence of Ph1 chromosome (arrow). Panel D: Pathological analysis of a teratoma from PB32 iPSC, showing a normal ectodermal, endodermal and mesodermal differentiation. M: Muscle; i: Intestinal tissue with mucus formation; g: Glial tissue; n: Neural crest; ca: Cartilage.

and TRA-1-60 (Fig. 1B). Cytogenetics analysis demonstrated the presence of Ph1 chromosome (Fig. 1C). Teratoma assays showed the presence of normal differentiation towards endodermal, ectodermal and mesodermal layers (Fig. 1D).

Materials and methods

Generation of CML iPSC

Cryopreserved leukemic CD34+ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained at diagnosis were thawed and expanded in Myelocult™ medium (Stemcell Technologies) supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Life technologies), hSCF (100 ng/ml), hFLT-3 (100 ng/ml), hIL-3 (20 ng/ml), hIL-6 (20 ng/ml) and hIL7 (20 ng/ml) (all of them from Peprotech) for 4 days. At day + 4, 2×10^5 CD34+ cells were then transduced overnight with Sendai viruses containing Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc (CytoTune®-iPS Sendai Reprogramming Kit, Life technologies), each of them at multiplicity of infection (MOI) of 15. Following the next 2 days, cell culture medium was changed daily and cells were resuspended in expansion medium after 5 minute centrifugation at $200 \times g$. At day + 3, cells were recovered by centrifugation and plated on Mitomycin-C-treated mouse embryonic fibroblasts (MEF, CD1 strain) in expansion medium for 2 additional days. At day 6, half of the medium was changed to human pluripotent stem cell medium (hPSC medium) based on DMEM/F12 supplemented with 20% Knock Out Serum Replacer, 1 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 100 μ M 2-mercaptoethanol (all of them from Life technologies) and 12.5 ng/ml basic FGF (Miltenyi Biotech). Then, the medium was changed daily with hPSC medium. 3–4 weeks after the lentiviral transduction, morphologically recognizable iPSC colonies appeared in culture for both cell lines. These colonies were manually picked and transferred to freshly Mitomycin-C-treated MEF for amplification.

After generation of a frozen stocks, iPSC could be cultured using either MEF co-culture technique or in feeder free conditions. The feeder cultures were performed on Mitomycin C-treated MEF layer as

described above with passaging every 7 days using 1 mg/ml collagenase IV in DMEM/F12 (Life technologies); the feeder-free culture was performed on Geltrex™ (Life technologies) in Essential 8 medium (Life technologies) and 1% penicillin/streptomycin with passaging every 3–4 days using in DPBS (Life technologies) supplemented with 0.5 mM EDTA (Life technologies) and 1.8 mg/l NaCl (Sigma).

Karyotyping and expression of BCR-ABL

For conventional cytogenetics, cells grown in 60 mm plates (Corning) on mitomycin-C treated MEF for 5 days were cultured 2 h in hPSC medium supplemented with 100 ng/ml Colcemid™ (Life technologies). Cells were detached from the plate by 5 min treatment with 1 ml per plate of TrypLE™ Express (Life technologies) at 37 °C, 5% CO₂. After trituration with a P1000 micropipet, 9 ml of 0.075 M KCl (Life technologies) were added to the cell suspension followed by incubation at 37 °C during 20 min to obtain an osmotic shock. Cell suspension was then prefixed by the addition of 1 ml of fixative composed of Methanol/Acetic Acid (3:1) followed by 10 minute centrifugation at $130 \times g$. Cell pellet was then resuspended in 10 ml of fixative and centrifuged 10 min at $130 \times g$ twice before a final resuspension in 10 ml of fixative. Cells were then spread on slides and stained with Giemsa. A minimum of 10 metaphases were captured and analysed using an automated imaging system (Meta Systems).

Pluripotency markers and BCR-ABL expression

For flow cytometry analysis, iPSC polyclonal stock and three clones PB32-1, PB32-4 and PB32-5 were recovered from Mitomycin-C inactivated MEF after incubation for 2 h in 1 mg/ml collagenase IV in DMEM/F12. After two cycles of washing/sedimentation with 10 ml DMEM/F12, colonies were washed once in Ca²⁺/Mg²⁺ free PBS (Life technologies) and then dissociated into a single cell suspension by 10 min incubation in Hank's balanced enzyme-free cell dissociation buffer (Life Technologies). For pluripotency marker analysis, 1×10^5

cells were incubated in 10 μ l PBS containing 1 μ l V450-conjugated mouse monoclonal anti-SSEA-4 and 1 μ l Alexa647-conjugated mouse monoclonal antibody anti-TRA1-60 (both from BD Biosciences) or conjugated isotype control. BCR-ABL expression was performed by both Q-RT-PCR and Western blots showing expression of BCR-ABL mRNA and protein in PB32 polyclonal iPSC and three clones (data not shown).

In vivo pluripotency analysis by teratoma formation

Teratoma assays were performed triplicate in order to analyze the development of potentially malignant tumor tissue within teratomas, by intramuscular injection of PB32 polyclonal iPSC and three clones in NSG mice (2.10^6 cells in 150 μ l of Geltrex/DMEMEF12 1:1 dilution). 10 weeks after injection, pathological analysis of teratomas was performed. This analysis revealed the presence of differentiated tissues including glial cells, neuroectodermal cells, intestinal cells and cartilage differentiation in all tumors with no evidence of malignancy, confirming the pluripotency of these cells (Fig. 1D).

Acknowledgements

This work was performed by the grant from INGESTEM national consortium.

References

- Chomel, J.C., Turhan, A.G., 2011. Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. *Oncotarget* 2, 713–727.
- Chomel, J.C., Bonnet, M.L., Sorel, N., Bertrand, A., Meunier, M.C., Fichelson, S., Melkus, M., Bennaceur-Griscelli, A., Guilhot, F., Turhan, A.G., 2011. Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease. *Blood* 118 (13), 3657–3660 (Sep 29).
- Jiang, X., Zhao, Y., Smith, C., Gasparetto, M., Turhan, A., Eaves, A., Eaves, C., 2007 May. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia* 21 (5), 926–935.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.

ARTICLE 2

(En soumission)

Evidence of increased hemangioblastic and early hematopoietic potential in chronic myeloid leukemia (CML)-derived induced pluripotent stem cells

Evidence of increased hemangioblastic and early hematopoietic potential in chronic myeloid leukemia (CML)-derived induced pluripotent stem cells

Dans ce travail, nous décrivons les expériences de caractérisation biochimique des cellules iPSC de LMC (Telliarn et al., 2016) ainsi que des expériences d'induction d'une différenciation hématopoïétique en utilisant les deux techniques les plus fréquemment utilisées, via la génération de corps embryonnaires (EB) ou de colonies blastiques (BI-CFC).

Les expériences que nous avons réalisées en premier lieu ont consisté en la démonstration de l'expression de BCR-ABL dans les cellules iPSC porteuses du chromosome Ph1. Les analyses par Q-RT-PCR ainsi que par Western blot ont confirmé l'expression (certes faible par rapport à la lignée UT7-11 transfectée par BCR-ABL) de BCR-ABL dans cette lignée au stade iPSC. Cette expression ne semblait pas diminuée en présence d'Imatinib au niveau protéique. Les mêmes expériences réalisées ; en utilisant un anticorps anti-phospho tyrosine ; ont montré que l'IM entraînait une diminution de la phosphorylation, à la fois de BCR-ABL mais aussi d'une de ses protéines cibles : CRK-L (Figure 2).

Nous avons ensuite testé le potentiel de différenciation de ces cellules vers le lignage hématopoïétique en utilisant deux techniques, d'une part via la génération des EB et d'autre part via la génération de BI-CFC. Nous montrons pour la première fois à notre connaissance, une augmentation du potentiel de différenciation vers les BI-CFC, avec une amplification de ces cellules *in vitro*. Les progéniteurs hématopoïétiques dérivés des BI-CFC ou des EB sont également augmentés de manière reproductible par rapport aux ES ou iPSC témoins, ces résultats suggérant le rôle de BCR-ABL dans ce phénomène d'amplification. Les progéniteurs dérivés présentent une sensibilité aux ITK (Imatinib et Dasatinib). Nous montrons enfin, comme cela a été montré dans les cellules leucémiques primaires de patients, que l'expression d'AHR est diminuée dans les iPSC de LMC et qu'il est possible de moduler la voie AHR par une manipulation pharmacologique en utilisant son antagoniste SR1, qui permet une amplification des cellules hématopoïétiques dérivées des iPSC.

Ces résultats suggèrent que les iPSC spécifiques de patient que nous décrivons peuvent permettre la modélisation de l'aspect myéloprolifératif de la maladie avec notamment une augmentation de ce potentiel dès le stade de BI-CFC. Des expériences *in vivo* seront nécessaires pour tester la possibilité de génération des CSH ayant un potentiel de reconstitution chez la souris immunodéficiente.

Evidence of increased hemangioblastic and early hematopoietic potential in chronic myeloid leukemia (CML)-derived induced pluripotent stem cells (iPSC)

Author names and affiliations:

G. Telliam^{a,b}, O. Féraud^{a,b,c}, F. Griscelli^{a,b,c}, S. Baykal^a, M. Gentil^a, D. Divers^{a,b,c}, A. Bennaceur-Griscelli^{a,b,c,e}, A.G. Turhan^{a,b,c,e}.

Affiliations:

a-INSERM U935, Université Paris Sud, 94800 Villejuif, France.

b-ESTeam Paris Sud, INSERM U935, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, 94800, Villejuif, France.

c- INGESTEM National iPSC Infrastructure, 94800 Villejuif, France

e- Division of Hematology, Paris Sud University hospitals, Le Kremlin Bicêtre 94275 and Villejuif, 94800, France

ABSTRACT

Hemangioblasts derived from mesodermal lineage are the earliest precursors of hematopoietic stem cells and endothelial cells. Embryonic stem cells (ESC) and induced pluripotent stem cells (iPSC) are the only experimental systems in which these cells can be assayed and quantified. Using CML-derived iPSC and blast-cell colony forming (Bl-CFC) assays, we show that hemangioblasts are highly expanded in CML-derived-iPSC compared to human H1-ESC-derived hemangioblasts. BCR-ABL signaling pathway is intact in these cells with evidence of Crk-L phosphorylation which is reduced by the use of Imatinib. Hematopoietic progenitor assays generated using blast-CFC demonstrates also a highly increased hematopoietic progenitor potential of these cells as compared to H1-ESC. The same results were also obtained using hematopoietic progenitor assays via embryoid-body formation. In CML iPSC we have also found a significant reduction of Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) expression which is involved in hematopoietic quiescence. Further inhibition of AHR using StemRegenin (SR1), an AHR antagonist, led to an increase of blast-cell colonies in CML iPSC as well as hematopoietic potential of CML iPSC. Thus our results show the establishment of a myeloproliferative phenotype using patient-derived iPSC with the presence of a major expansion of the hemangioblast compartment and derived hematopoietic progenitors in this context as well as further expansion of this potential by the manipulation of AHR pathway.

INTRODUCTION

Chronic myeloid leukemia is the prototype of hematopoietic stem cell malignancy involving highly primitive hematopoietic stem cells (HSC). The disease presents essentially by the expansion and proliferation in peripheral blood of differentiated cells and hematopoietic progenitors of myeloid lineage but lymphoid B cells lineage can also be involved (Martin et al., 1982). There is a controversy regarding the involvement of endothelial lineage in CML which would suggest that a stem cell with both hematopoietic and endothelial potential would be the target of transformation by BCR-ABL (Fang, 2005; Otten et al., 2008).

Patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSC) represent a powerful tool to modelize several types of disease (Zeltner and Studer, 2015) and especially chronic myeloid leukemia (Bedel et al., 2013; Hu et al., 2011; Kumano et al., 2012; Suknuntha et al., 2015). For the first time, we report here that the earliest common hematopoietic and endothelial precursor designed as hemangioblast is highly expanded in stem cells assays using iPS cell lines derived from a patient with CML. We show that CML-derived iPSC generates high numbers of hemangioblast assayed by blast-cell colony forming assay. Likewise hematopoietic progenitors derived from either blast-CFC or embryoid bodies are also highly increased in CML-derived iPSC. Finally, we show the potential of manipulating this expansion by using AHR pathway.

MATERIALS AND METHODS

Patient-derived iPSC and characterization.

The generation of CML iPSC has been previously described (Telliam et al., 2016). Briefly, peripheral blood cells were obtained at diagnosis from a 14-year old CML patient with informed consents according to the declaration of Helsinki. This patient was treated with Imatinib mesylate as a first line therapy. At 12 months post-therapy there was no major molecular response and an allogenic bone marrow transplant was performed. The patient remains in complete remission since the transplant performed in 2004. To generate iPSC, leukemic CD34⁺ isolated and cryopreserved at diagnosis were used as previously described (Telliam et al., 2016). All analyses were performed using a polyclonal stock of iPSC. This cell line designed as PB32 was characterized by using in vitro and in vivo pluripotency tests as previously described (Telliam et al., 2016).

iPSC and ESC cultures.

hPSC cell lines were maintained on the mitomycin-C-inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells with DMEMF12 supplemented with 0.1mg/ml bFGF and treated 2h with 1mg/ml Collagenase type IV (gibco by life technologies ref 17104-019). H1 cell line was used as previously described, after the authorization obtained from the “Agence de Biomedicine” (Bennaceur-Griscelli, 2007). For cultures with Imatinib mesylate, cells were cultured for 5 days at 1 μ M before protein extraction.

Embryoid body assays.

For Embryoid Body (EB) formation, ES and iPS cells, at day 6–7 after cell passage, were treated with collagenase IV. Clumps were cultured in Iscove’s modified Dulbecco’s medium (IMDM, Invitrogen) supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 1 mM L-glutamine, 15% fetal calf serum (FCS, Invitrogen), 450 μ M monothioglycerol, 50 μ g/mL ascorbic acid (Sigma Aldrich) and 200 μ g/L transferrin (Sigma Aldrich) and supplemented with hematopoietic cytokines: 100 ng/mL stem cell

factor (SCF), 100 ng/mL fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3L) and 50 ng/mL thrombopoietin (TPO) (all from Peprotech). ES and IPS derived EB were cultured in ultra low attachment 6-well plates (Costar) for 16 days. Media was changed two or three times depending on EB proliferation. All cultures were incubated at 37°C in 5% CO₂. For cultures with Imatinib mesylate, cells were cultured for 16 days at 1µM before protein and RNA extraction.

Blast-colony forming assays.

To obtain blast colonies (BL-CFC), iPSC pellet was resuspended in Stemline II Hematopoietic Stem Cell Expansion medium (Sigma-Aldrich S0192) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and L-glutamine, 50ng/ml rhVEGF (Peprotech) and 50ng/ml rhBMP4 (Peprotech). After 48h we added 20ng/ml of rhSCF (Peprotech), rhTPO (Miltenyi Biotec) and rhFLT3L (Peprotech). The embryoid bodies obtained at day 3.5 were collected, dissociated with pre-heated stable trypsin replacement enzyme TrypLE Express (Gibco by life technologies ref 12605-10) and filtered with 40µm Nylon Mesh sterile cell strainer (Fisher Scientific). Cells were resuspended in Stemline II Hematopoietic Stem Cell Expansion medium (Sigma-Aldrich S0192) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and L-glutamine, 50ng/ml rhVEGF, rhBMP4, rhFLT3L and rhTPO, 20ng/ml FGFb (Peprotech) and 5Units/ml EPO (Peprotech) and transferred in Methocult SF H4436 (Stem cell technologies) for 5 to 7 days.

Hematopoietic differentiation

CFC assays from ES and iPS cells from EB or BL-CFC were performed by plating 10×10^3 cells/mL into MethoCult GF (H4435 StemCell Technologies) in triplicate. For ITK conditions, MethoCult GF were supplemented with 1µM Imatinib mesylate or 5nM Dasatinib. Hematopoietic colonies (BFU-E, CFU-M, CFU-G, CFU-GM and Mixte) were counted at day 14 according to standard morphological

criteria. CFC assay was performed by the same manipulator during all clonogenic differentiation experiments.

RNA and Q-RT PCR analyses

Total RNA was isolated using TRIzol (Ambion from Life technologies ref 15596026) extraction protocol and treated with DNase I (Invitrogen). cDNA was synthesized using affinity script multi temperature cDNA synthesis kit. PCR amplification was conducted with Fast start DNA polymerase (Roche) or Platinum taq (thermofisher).

For BCR-ABL RT-PCR we used the European Leukemia Network primers (BCR-F: TGACCAACTCGTGTGTGAACTC; ABLK-F: CGCAACAAGCCCACTGTCT; ABLK-R: TCCACTTCGTCTGAGATACTGGATT). The other primers used are listed in Table 2.

q-RT PCR amplification was conducted with TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystems). Amplification products were run in a 1% or 0,8% agarose electrophoresis gel and detected with the GenoView UV Transilluminator. Unpaired t.test with Welch's correction was performed from Prism software.

Phenotypic analysis of hematopoietic progenitors

Hematopoietic cells were obtained using both EB and Blast-CFC generation. To analyze hematopoietic cells from EB differentiation, cells were dissociated with pre-warmed stable trypsin replacement enzyme TrypLE Express (gibco by life technologies ref 12605-10) and filtered with 70µm Nylon Mesh sterile cell strainer (Fisher Scientific). Living cells were counted in Trypan blue and stained.

To analyze hematopoietic cells from Bl-CFC, after 5 days from blast colony differentiation, the methylcellulose was washed 3 times with PBS. The pellet was resuspended in Iscove's MDM medium and filtered with 70µm Nylon Mesh sterile cell strainer (Fisher Scientific). Living cells were counted in trypan blue and stained with the following antibodies in PBS 4%BSA at 4°C for 45 minutes : CD45Pe-

Vio770 (Miltenyi), CD34Vioblue (Miltenyi), CD41aPE (BD), CD43FITC (Miltenyi), CD309APC (BD), CD31FITC (Beckman Coulter), CD235aAPC (BD), CD144FITC (Miltenyi), BB9PE (BD). After 1h, cells were washed and resuspended in PBS 4%BSA with viability staining reagent 1 μ g/ml (7-AAD) 7-aminoactinomycin D (Sigma Aldrich). Stained cells were analyzed with a MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec) flow cytometer and Flowjo analysis software.

Western Blots

The cells were lysed in ice with RIPA buffer containing (NaCl [200mM], Tris [pH 8; 50mM], Nonidet P40 [1%], acide deoxycholate [0.5%], SDS [0.05%], EDTA [2mM]) supplemented with 100 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1mM sodium fluoride (NaF), 1mM orthovanadate (Na₃VO₄). Separation of proteins was done by electrophoretic migration on a 3-8% polyacrylamide gel under denaturing conditions. The proteins are then transferred in a semi-liquid condition on PVDF membrane pre-activated in methanol. After saturation with TBS Tween 5% BSA for 1h and hybridization of the membranes with primary overnight (BCR-ABL Ab3 Calbiochem, pCrkL Tyr207 Cell Signaling, pTYR 4G10 Millipore) and secondary 1h antibodies coupled to HRP, the signal is revealed by chemiluminescence with SuperSignal West Dura or Femto reagents and acquire with G:BOX iChemi Chemiluminescence Image Capture system.

AHR experiments.

During BI-CFC differentiation at day 3.5, dissociated cells were separated in 3 to make the 3 conditions into MethoCult GF control, supplemented with 1 μ M SR1 (Sigma Aldrich) or 100nM FICZ (Sigma Aldrich). After 5 days the methylcelluloses were washed and counted with Trypan blue.

Statistical analyses.

Unpaired t.test and Two way ANOVA statistical analysis were performed with PRISM software from at least 3 experiments.

RESULTS

BCR-ABL expression in CML iPSC

BCR-ABL expression was analyzed in CML iPSC at pluripotent stage by first with Western blots in the presence of appropriate controls which were PB33 (iPSC without Ph1 chromosome), H1 (human ESC), K562 cell line, UT7 cell line and its counterpart expressing BCR-ABL (UT7-11). BCR-ABL was not detected in control embryonic stem cell line H1, IPS cell line PB33 and hematopoietic cell line UT7 (**figure 1A**). The CML iPSC PB32 expressed BCR-ABL protein but at much lower levels as compared to CML cell lines K562 and UT7-11. The analysis performed after Imatinib Mesylate (IM) treatment did not reveal any difference in protein expression. A quantification of BCR-ABL gene expression level with and without IM in CML-IPSC also showed no significant difference (**figure 1B**).

BCR-ABL signaling in CML iPSC

The next question we asked was to determine if at the pluripotent stage, CML iPSC was able to generate a tyrosine kinase activity, by either autophosphorylation or by phosphorylation of the Crk-L protein. To evaluate this hypothesis, we used Western blots using the pTYR4G10 phosphotyrosine antibody. As it can be seen in Figure 2A, PB32 cells showed a highly phosphorylated BCR-ABL p210 protein as compared to control IPSC. Furthermore this phosphorylation level corresponding to p210 BCR-ABL was decreased after imatinib treatment, suggesting the detection of an autophosphorylated BCR-ABL in PB32 cells (**figure 2A**). We then looked for the phosphorylation of Crk-L, the surrogate BCR-ABL target. We used an antibody against its phosphorylated form in CML-IPSC (3 independent experiments). As seen in Figure 2B, Tyrosine CrkL phosphorylated form was present in CML-IPSC

and it significantly decreased after imatinib treatment (Mann Whitney pvalue 0,03). We confirmed this observation with ImageJ quantification relative to the level of b-ACTIN (**figure 2B**). These results therefore suggested that BCR-ABL signaling is preserved in CML iPSC, at least as assessed by its phosphotyrosine generation potential.

CML-derived iPSC generate high numbers of blast CFC *in vitro*.

BI-CFC; generated according to the technique previously published (Lu et al., 2007); were quantified in the methylcellulose from day 5 to day 7. At day 5, we observed different types of small, either tight or diffuse colonies comprised of uniformly round cells corresponding to BI-CFC (**figure 3B**). As compared to H1 control, we observed a 4-fold increase of the BI-CFC clonogenic potential in the CML derived IPSC (unpaired t.test with Welch's correction $p = 0.0037$) (in > 3 independent experiments in duplicate) (**figure 3A**). The human IPS cell line control PB33 failed to generate BI-CFC in most experiments.

To characterize these blast cell colonies, we performed FACS analysis after collecting day 5 BI-CFC from methylcellulose cultures (n= 4 experiments). As compared to BI-CFC generated from H1-ESC, BI-CFC derived from CML-IPSC expressed significantly less CD34 marker (9% versus 22% in H1, $p = 0,0069$) and significantly more CD45 (10% vs 5% respectively, $p = 0,0156$)(**figure 3C**). These results suggested that CML BI-CFC had higher proliferative potential and were more committed to hematopoietic lineage.

In addition, FACS analyses of CML-BI-CFC showed expressions of both hematopoietic and endothelial markers (**supp figure 1**). These cells co-expressed CD309, VEGF-R, CD34, as well as CD31. Cells co-expressing the VE-cadherin (CD144) with CD309, BB9 or CD34 were also present. In addition, a clear hematopoietic nature of these cells was identified by the generation of CD45+ cells expressing CD43 and CD34.

We also showed that CML BI-CFC express IL1RAP which has been shown to be a marker of primitive CML stem cells (Landberg et al., 2016). IL1-RAP+ cells co-expressed CD45.

BI-CFC and embryoid body-mediated hematopoietic clonogenic cell potential is increased in CML-iPSC

We performed hematopoietic differentiation using CFU assay from BI-CFC or EB (at least 3 independent experiments) (**figure 4**). These experiments showed a major and reproducible increase of CFC number EB and BI-CFC generated from PB32 as compared to H1 cell line, a cell line which is a reference for its hematopoietic potential (Kaufman et al., 2001). As a matter of fact, seeding of 10×10^3 CML BI-CFC generated approximately 5 times more hematopoietic colonies of all types (**figure 4A-B**) as compared to those produced from H1 BI-CFC. Similarly, seeding of PB32 EB's generated 5 to 8 times more hematopoietic colonies as compared to control EB, this increase being highly significant (ANOVA test with multiple comparison on PRISM software pvalue <0.0001).

One interesting finding was the fact that we have observed a constantly higher hematopoietic potential when BI-CFC were used as compared to EB-derived hematopoiesis (**Figure 4A**).

Evaluation of BCR-ABL expression in progenitor cells

As we have generated BI-CFC and EB-derived hematopoietic cells from the iPSC expressing BCR-ABL as described above, the next question was to determine if these primitive cells expressed also BCR-ABL after differentiation. These experiments showed the expression of BCR-ABL mRNA in both BI-CFC and EB (**figure 5A**). This expression was confirmed in Western blots (**figure 5B**). CML-iPSC derived BI-CFC expressed significantly more BCR-ABL mRNA than that observed in EB (unpaired t.test with Welch's correction $p = 0,0006$) (**figure 5A**).

The use of P-Tyr antibodies showed also a higher expression of phosphorylated BCR-ABL, in CML Bl-CFC (**figure 5B**).

Evaluation of the integrity of the BCR-ABL signaling at the level of embryoid bodies

The next question we have addressed was to determine if at the stage of EB's where hematopoietic commitment occurs (Keller et al., 1993), the tyrosine kinase activity of BCR-ABL was sufficiently active to phosphorylate the surrogate marker Crk-L. To determine this event, we looked for the phosphorylated form of BCR-ABL (pBCR-ABL) using western blot analysis. As shown in Figure 6A the phosphorylated p210 band was detected only in our PB32-EB as well as our BCR-ABL-expressing cell line UT7-11 (**Figure 6A**). The use of Imatinib induced a major decrease of pBCR-ABL band in PB32 EB (**Figure 6A**, lane 6). Similarly, phospho-CrkL expression was highly increased in PB32 EB's protein extracts, (**Figure 6A**, lane 5) and CrkL phosphorylation was reduced upon IM treatment of the cells (**Figure 6A**, Lane 6 and **Figure 6B**). Interestingly, Imatinib also induced a decrease of CrkL phosphorylation in CTLs EB (**Figure 6A**, Lanes 8 and 10 and **Figure 6B**).

Evaluation of the sensitivity of CML-iPSC-derived progenitors to tyrosine kinase inhibitors.

As BCR-ABL was functional in our CML-IPSC at different stages of differentiation, we next asked whether we could determine if TKI could influence the growth of hematopoietic progenitors. We have then performed CFC assays in the presence or in the absence of TKI and we have used for this purpose Imatinib and Dasatinib. CML-EB derived CFC were highly increased as compared to control (**Figure 7**). The use of IM and Dasatinib reduced the CFC growth by approximately 50 % (n = 3 independent experiments) and this inhibition was highly significant (ANOVA p = 0.002) (**Figure 7**).

Further characterization of CML-iPSC derived hematopoietic cells by expression of genes involved in hematopoietic development.

Hematopoietic commitment in adult is under the control of a well-defined set of genes. We analyzed the expression of some of these genes during differentiation from iPSC to Bl-CFC or EB derived hematopoietic progenitors (**figure 8 gene expression** and Table 1). As shown in figure 8 the expressions of PU.1, Gfi.1 and C-myb were found to be increased in Bl-CFC compared to EB. Furthermore, Ikaros and GATA3 which are usually expressed in T lymphocytes lineage are also highly expressed in H1 derived and CML derived Bl-CFC. Surprisingly, Lmo2 is only expressed in CML-iPSC derived Bl-CFC (**Figure 8**). CXCR4 expression was found to be downregulated in CML Bl-CFC or EB (**Figure 8**).

Evaluation of AHR expression in CML and control pluripotent cells.

Aryl hydrocarbon receptor signaling has been shown to be involved in hematopoietic cell cycle and particularly in HSC quiescence (Singh et al., 2009). We have previously showed that AHR expression is downregulated in primary CML cells, potentially contributing to the myeloproliferative phenotype of CML (Gentil, 2015). We have therefore analyzed the expression of AHR in CML iPSC as compared to control iPSC. CML iPSC expressed significantly lower level of AHR mRNA as compared to control iPSC but this level was equivalent to the one observed in hES cell line H1 (n=3 independent experiments, $p = 0.0095$) (**Figure 9A**).

Evaluation of the effects of AHR antagonism.

The inhibition of AHR signaling by the use of AHR antagonist StemRegenin (SR1) has been shown to lead to an expansion of hematopoietic progenitors (Boitano et al., 2010). To examine AHR expression in the context of CML-expressing iPSC, we first performed q-RT-PCR to determine the levels of AHR mRNA. As it can be seen in Figure 9A, there was a significant reduction of AHR expression in CML-iPSC as compared to PB33 control iPSC (**Figure 9A**). To determine the effects of AHR antagonism in this context, we have then performed experiments at two different stages of differentiation, as described in Figure 9B. As it can be seen in this figure, we generated BI-CFC either in the presence or in the absence of SR1 added to the cultures (**Figure 9B**). From BI-CFC generated this way, we have then performed hematopoietic differentiation using CFC assays in the presence or in the absence of SR1.

We first analyzed the effects of SR1 on the BI-CFC potential of PB32 CML iPSC. There was a major increase of BI-CFC numbers when SR1 was added to the cultures. We next analyzed the potential of the BI-CFC generated using SR1 towards hematopoietic differentiation. Quantitative and qualitative analyses of hematopoietic cells generated in these cultures in the absence or in the presence of SR1 are shown in Figure 9C. There was a significant increase of hematopoietic cells proliferation when SR1 was used, based on cell count and CD45 cell surface marker (n= 3 independent experiments) (**Figure 9C**). After the phenotypic characterization, we also showed that SR1 addition yielded increased numbers of hematopoietic cells expressing CD45+CD33+ (**Supplementary Figure 2**). Cells expressing CD45+CD31+ markers were also increased by AHR signaling inhibition (**Supplementary Figure 2**).

DISCUSSION

The elusive nature of the most primitive CML stem cells which are very difficult to study in human samples, stimulated a major research during the last 10 years to generate models of CML stem cells (Sloma et al., 2010). As a matter of fact, primary CML stem cells, which are very difficult to isolate and expand, are at the origin of relapses upon discontinuation of TKI therapies (Lee et al., 2016; Mahon et al., 2010; Ross et al., 2013). Several murine CML models have been developed to this purpose but they do not faithfully recapitulate the most primitive human CML cells phenotype. The use of murine embryonic stem cell models are of interest, as the overexpression of BCR-ABL has been shown to be a major stimulus for generation of long-term leukemic hematopoiesis (Melkus et al., 2013; Perlingeiro et al., 2001; Peters et al., 2001). However, one of the limitations of the ESC models is the need to overexpress BCR-ABL under the control of different promoters, potentially leading to results not relevant to the pathophysiology of human CML. With the advent of iPSC technology, it became of major interest to use human CML cells for reprogramming with the goal of reproducing the earliest stages of human CML and potentially to use them for drug screening purposes. The first work published in this field showed the feasibility of reprogramming the human CML cell line KBM to pluripotency (Carette et al., 2010) with the possibility of generating BCR-ABL-expressing CD45+ cells. Other groups used primary CD34+ leukemic cells which have been shown to be induced to pluripotency using different methodologies (Bedel et al., 2013; Kumano et al., 2012). The usefulness of this technology lies on the fact that it becomes possible to obtain an unlimited number of primitive cells using the background of the primary leukemic cells in any given patient. However, experiments aiming to generate increased hematopoietic potential have been disappointing. In fact some groups showed that CML iPSC expressed very low levels of BCR-ABL and did not generate a myeloproliferative phenotype (Bedel et al., 2013; Kumano et al., 2012). One group showed the possibility of using CML iPSC to discover a novel signaling pathway operational in human CML (Suknuntha et al., 2015).

Our iPS cell line used in our experiments was generated from the primary leukemic cells of a 14-year old patient with TKI-resistant leukemia (Telliam et al 2016). This patient had no evidence of ABL-kinase domain mutation and the reason of Imatinib resistance was not determined. The first goal of the reprogramming of the patient's leukemic cells was to determine if BCR-ABL expression and induced signaling could be maintained at different stages. We show here that BCR-ABL expression is present at the most primitive iPSC stage. Its autophosphorylation is present in this context as it would have been expected in an adult leukemic cell context. Similarly, we show here that during the differentiation process through the stages of hemangioblasts and EB, BCR-ABL expression remains intact with evidence of tyrosine-phosphorylation (Figure 5B). In CML EB, the downstream target Crk-L is phosphorylated (Figure 6A, 6B) and BCR-ABL phosphorylation is reduced by IM treatment (Figure 6A). This allowed us to perform TKI sensitivity experiments showing that these cells indeed respond to TKI inhibition at the level of CFC. This inhibition was seen with both IM and Dasatinib (Figure 7). The patient at the origin of the iPSC was shown to be clinically resistant to Imatinib but the sensitivity of his cells in CFC experiments was not performed at diagnosis.

To further characterize these iPSC, we have analyzed the expression of genes involved in hematopoietic development at different stages of differentiation as compared to H1 ESC and adult hematopoietic cells. CML iPSC did not express any of the hematopoietic genes tested (PU.1, c-Myb, Gfi1, Gfi1b, LMO2, GATA3, Ikaros) nor CXCR4 (Figure 8). The expression of these genes appeared during differentiation and as compared to H1-derived EB, CML EB showed a slight increase of Gfi1b, CXCR4 and c-Myb expression (Figure 8). At Bl-CFC stage, the expression of GATA3 was found to be higher as compared to EB stage and interestingly Lmo2 expression was detectable only in CML Bl-CFC (Figure 8). c-Myb in particular has been shown to play a role in BCR-ABL-induced leukemogenesis (Lidonnici et al., 2008).

For the first time to our knowledge, our data also show that AHR pathway; which we have shown to be downregulated in adult CML cells; is also downregulated in CML iPSC. We do not know so far

whether this downregulation is specific to CML-iPSC because ES cells were shown to exhibit a downregulation of AHR under OCT4 influence (Kang and Wang, 2015). We used the antagonism of this pathway to show that it is possible to further expand hematopoietic cells of the CML iPSC.

In summary, we have generated and characterized a unique CML iPSC from a TKI-resistant patient's leukemic cells. These cells partly recapitulate some features of the disease with essentially a myeloproliferative phenotype. This phenotype could be modulated by the antagonism of the AHR pathway which we have shown to be efficient in adult primary CML cells. iPSC-derived cells expressing BCR-ABL are able to tyrosine-phosphorylate downstream targets. This phosphorylation is responsive to TKI inhibition. It will be interesting to determine the gene profiling of the hematopoietic cells derived from iPSC compared to primary leukemic cells of the same patient. Finally, further experiments will be needed to test the possibility of generating long-term hematopoiesis from these patient-specific iPSC after transplantation of iPSC-derived EB or BI-CFC in immunodeficient mice.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: BCR-ABL expression in CML IPS PB32. (A) Western blot analysis of BCR-ABL protein (lane 1 and 3) in positive controls CML cell lines K562 and UT7-11; (lane 2) in negative control normal hematopoietic cell line UT7; (lane 4 and 5) in CML IPS PB32 with and without Imatinib; (lane 6 to 9) in control embryonic stem cell line H1 and non Ph⁺ control IPS cell line PB33 with and without imatinib, made from 3 independent experiments. **(B)** Expression profile of BCR-ABL gene by q-RT PCR in CML IPS PB32 with and without Imatinib (n = 3 independent experiments), unpaired t.test was performed.

Figure 2: BCR-ABL phosphorylation level in CML IPS PB32. (A) Western blot analysis of BCR-ABL phosphorylation level with phospho-tyrosine antibody (4G10 clone) (lane 1 and 2) in positive and negative controls CML cell lines UT7-11 and UT7; (lane 3 and 4) in CML IPS with and without Imatinib; (lane 5 and 6) in non Ph⁺ control IPS cell line PB33 with and without imatinib, made from 3 independent experiments. **(B)** ImageJ quantification of pCRKL protein in CML IPS cell line with and without Imatinib (n = 3 independent experiments). Mann-Whitney test was performed (p value = 0,03).

Figure 3: Impact of BCR-ABL expression in hematopoietic potential of CML IPS derived BL-CFC. (A) Blast colony forming cells (BL-CFC) count derived from control embryonic stem cell and CML IPS, unpaired t.test with Welch's correction was performed (p value = 0.0037). **(B)** Pictures of BL-CFC. **(C)** Flow cytometry analysis of hematopoietic markers CD34 and CD45 in BL-CFC derived from control ESC (H1) and CML IPS (n > 3 independent experiments), unpaired t.test was performed from % obtained in each experiment (p value = 0,0069 and 0,0156 respectively).

Figure 4: Hematopoietic differentiation from BL-CFC and EB derived from CML hiPSC. (A) Colony forming cell (CFC) count from $10 \cdot 10^3$ control and CML BL-CFC or EB (at least 3 independent experiments), ANOVA test with multiple comparison was performed (pvalue <0.0001).

(B) Pictures of hematopoietic cell colonies: CFU-GEMM, CFU-E, CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM, CFU-G (from top to bottom and left to right).

Figure 5: BCR-ABL expression in progenitor cells derived from CML IPS. (A-left) Nested PCR of BCR-ABL, following by tyrosine kinase amplification in CML IPS-derived blast colony forming cells (BL-CFC) and embryoid bodies (EB). **(A-right)** Expression profile of BCR-ABL gene by q-RT PCR in CML IPS derived BL-CFC and EB from 3 independent experiments, unpaired t.test with Welch's correction was performed (p value = 0,0006). **(B-left)** Western blot analysis of BCR-ABL phosphorylation level with phospho-tyrosine antibody and **(B-right)** ImageJ quantification of pTYR in IPS-derived EB and BL-CFC

Figure 6: BCR-ABL phosphorylation level and signalization with TKI induction. (A) Western blot analysis of BCR-ABL phosphorylated protein and CRKL phosphorylation in CML and control EB with and without 1 μ M Imatinib compared to negative and positive control cell lines UT7 and UT7/11. **(B)** ImageJ quantification of pCRKL signal compared to b-ACTIN.

Figure 7: TKI sensitivity of hIPSC derived hematopoietic cells. Hematopoietic cell colonies (CFC) count from CML and control EB derived from hIPSC with and without 1 μ M Imatinib or 5nM Dasatinib (n = 3 independent experiments), ANOVA test was performed (p value = 0.002).

Figure 8: Hematopoietic genes expression profile. RT-PCR analysis of hematopoietic genes in (lane 1 and 2) negative control ESC (H1) and CML IPSC; (lane 3) positive control PBMC; (lane 4 and 5) BL-CFC derived from H1 or CML IPSC; (lane 6 and 7) EB derived from H1 and CML IPSC; (lane 8) BL-CFC derived from CTL IPSC.

Figure 9: Hematopoietic potential modulation by AHR signaling. (A) Expression level of AHR gene in control and CML IPSC. **(B)** Representation of the experimental approach. Fold change of BL-CFC +/- SR1 derived from CML hIPSC. **(C-left)** CFC count from CML BL-CFC +/- SR1. **(C-right)** Pourcentage of CD45^{high} cell population from CFC +/- SR1 derived from BL-CFC +/- SR1.

SUPPLEMENTARY DATA

Table 1: Hematopoietic genes expression

Table 2: List of genes primers

Figure 1: Phenotypic characterization of CML Bl-CFC

Figure 2: Phenotypic characterization of CML hematopoietic CFC +/- SR1

REFERENCES

- Bedel, A., Pasquet, J.-M., Lippert, E., Taillepiere, M., Lagarde, V., Dabernat, S., Dubus, P., Charaf, L., Beliveau, F., de Verneuil, H., et al. (2013). Variable behavior of iPSCs derived from CML patients for response to TKI and hematopoietic differentiation. *PloS One* 8, e71596.
- Bennaceur-Griscelli, A. (2007). Agence de biomédecine autorisation.
- Boitano, A.E., Wang, J., Romeo, R., Bouchez, L.C., Parker, A.E., Sutton, S.E., Walker, J.R., Flaveny, C.A., Perdew, G.H., Denison, M.S., et al. (2010). Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329, 1345–1348.
- Carette, J.E., Pruszk, J., Varadarajan, M., Blomen, V.A., Gokhale, S., Camargo, F.D., Wernig, M., Jaenisch, R., and Brummelkamp, T.R. (2010). Generation of iPSCs from cultured human malignant cells. *Blood* 115, 4039–4042.
- Fang, B. (2005). Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics. *Blood* 105, 2733–2740.
- Gentil, M. (2015). 4013 Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Pathway Directly Controls Hematopoietic Proliferation in Chronic Myeloid Leukemia (CML) and Its Inhibition Allows Massive Expansion of Leukemic Progenitors and Stem Cells. p.
- Hu, K., Yu, J., Suknuntha, K., Tian, S., Montgomery, K., Choi, K.-D., Stewart, R., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2011). Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood* 117, e109-119.
- Kang, B., and Wang, Y.-J. (2015). Bidirectional talk between AhR and Oct4. *Oncotarget* 6, 15740–15741.
- Kaufman, D.S., Hanson, E.T., Lewis, R.L., Auerbach, R., and Thomson, J.A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10716–10721.
- Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T., and Wiles, M.V. (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol. Cell. Biol.* 13, 473–486.
- Kumano, K., Arai, S., Hosoi, M., Taoka, K., Takayama, N., Otsu, M., Nagae, G., Ueda, K., Nakazaki, K., Kamikubo, Y., et al. (2012). Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood* 119, 6234–6242.
- Landberg, N., Hansen, N., Askmyr, M., Ågerstam, H., Lassen, C., Rissler, M., Hjorth-Hansen, H., Mustjoki, S., Järås, M., Richter, J., et al. (2016). IL1RAP expression as a measure of leukemic stem cell burden at diagnosis of chronic myeloid leukemia predicts therapy outcome. *Leukemia* 30, 255–258.
- Lee, S.-E., Choi, S.Y., Song, H.-Y., Kim, S.-H., Choi, M.-Y., Park, J.S., Kim, H.-J., Kim, S.-H., Zang, D.Y., Oh, S., et al. (2016). Imatinib withdrawal syndrome and longer duration of imatinib have a close association with a lower molecular relapse after treatment discontinuation: the KID study. *Haematologica* 101, 717–723.

- Lidonnici, M.R., Corradini, F., Waldron, T., Bender, T.P., and Calabretta, B. (2008). Requirement of c-Myb for p210BCR/ABL-dependent transformation of hematopoietic progenitors and leukemogenesis. *Blood* 111, 4771–4779.
- Lu, S.-J., Feng, Q., Caballero, S., Chen, Y., Moore, M.A.S., Grant, M.B., and Lanza, R. (2007). Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat. Methods* 4, 501–509.
- Mahon, F.-X., Réa, D., Guilhot, J., Guilhot, F., Huguet, F., Nicolini, F., Legros, L., Charbonnier, A., Guerci, A., Varet, B., et al. (2010). 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.* 11, 1029–1035.
- Martin, P.J., Najfeld, V., and Fialkow, P.J. (1982). B-lymphoid cell involvement in chronic myelogenous leukemia: implications for the pathogenesis of the disease. *Cancer Genet. Cytogenet.* 6, 359–368.
- Melkus, M., Bennaceur-Griscelli, A., Valogne, Y., Flamant, S., Chomel, J.-C., Sorel, N., Bonnet, M.-L., Deininger, M.W., Mitjavila-Garcia, M.-T., and Turhan, A.G. (2013). Biological effects of T315I-mutated BCR-ABL in an embryonic stem cell-derived hematopoiesis model. *Exp. Hematol.* 41, 335–345.e3.
- Otten, J., Schultze, A., Schafhausen, P., Otterstetter, S., Dierlamm, J., Bokemeyer, C., Brummendorf, T.H., Fiedler, W., and Loges, S. (2008). Blood outgrowth endothelial cells from chronic myeloid leukaemia patients are BCR/ABL1 negative. *Br. J. Haematol.* 142, 115–118.
- Perlingeiro, R.C., Kyba, M., and Daley, G.Q. (2001). Clonal analysis of differentiating embryonic stem cells reveals a hematopoietic progenitor with primitive erythroid and adult lymphoid-myeloid potential. *Development* 128, 4597–4604.
- Peters, D.G., Klucher, K.M., Perlingeiro, R.C., Dessain, S.K., Koh, E.Y., and Daley, G.Q. (2001). Autocrine and paracrine effects of an ES-cell derived, BCR/ABL-transformed hematopoietic cell line that induces leukemia in mice. *Oncogene* 20, 2636–2646.
- Ross, D.M., Branford, S., Seymour, J.F., Schwarzer, A.P., Arthur, C., Yeung, D.T., Dang, P., Goyne, J.M., Slader, C., Filshie, R.J., et al. (2013). Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* 122, 515–522.
- Singh, K.P., Casado, F.L., Opanashuk, L.A., and Gasiewicz, T.A. (2009). The aryl hydrocarbon receptor has a normal function in the regulation of hematopoietic and other stem/progenitor cell populations. *Biochem. Pharmacol.* 77, 577–587.
- Sloma, I., Jiang, X., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. (2010). Insights into the stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 24, 1823–1833.
- Suknuntha, K., Ishii, Y., Tao, L., Hu, K., McIntosh, B.E., Yang, D., Swanson, S., Stewart, R., Wang, J.Y.J., Thomson, J., et al. (2015). Discovery of survival factor for primitive chronic myeloid leukemia cells using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 15, 678–693.

Telliam, G., Féraud, O., Griscelli, F., Opolon, P., Divers, D., Bennaceur-Griscelli, A., and Turhan, A.G. (2016). Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with chronic myeloid leukemia (CML) resistant to targeted therapies. *Stem Cell Res.* 17, 235–237.

Zeltner, N., and Studer, L. (2015). Pluripotent stem cell-based disease modeling: current hurdles and future promise. *Curr. Opin. Cell Biol.* 37, 102–110.

Figure 1A

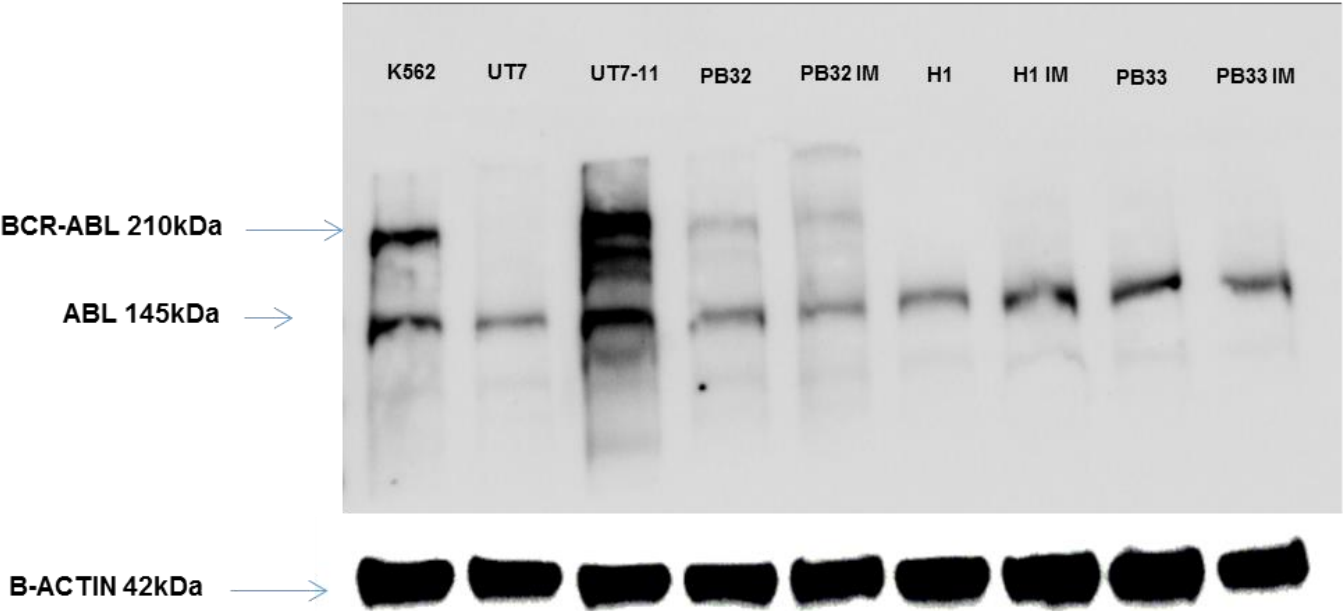


Figure 1B

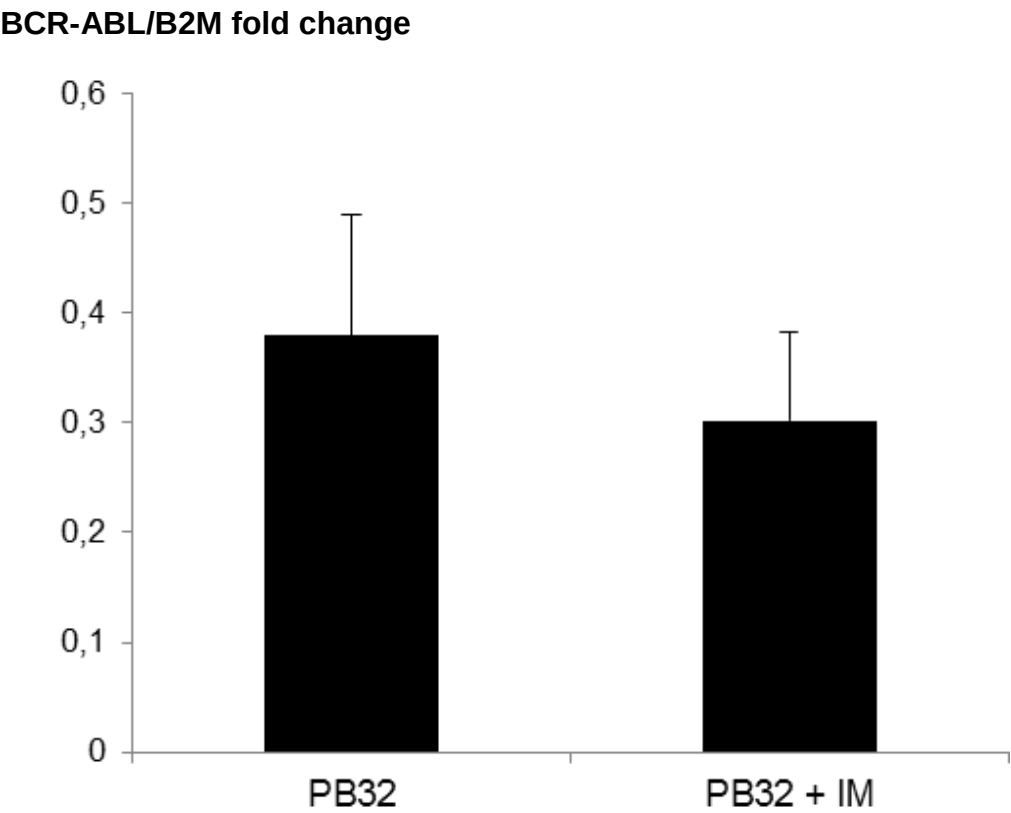


Figure 2A

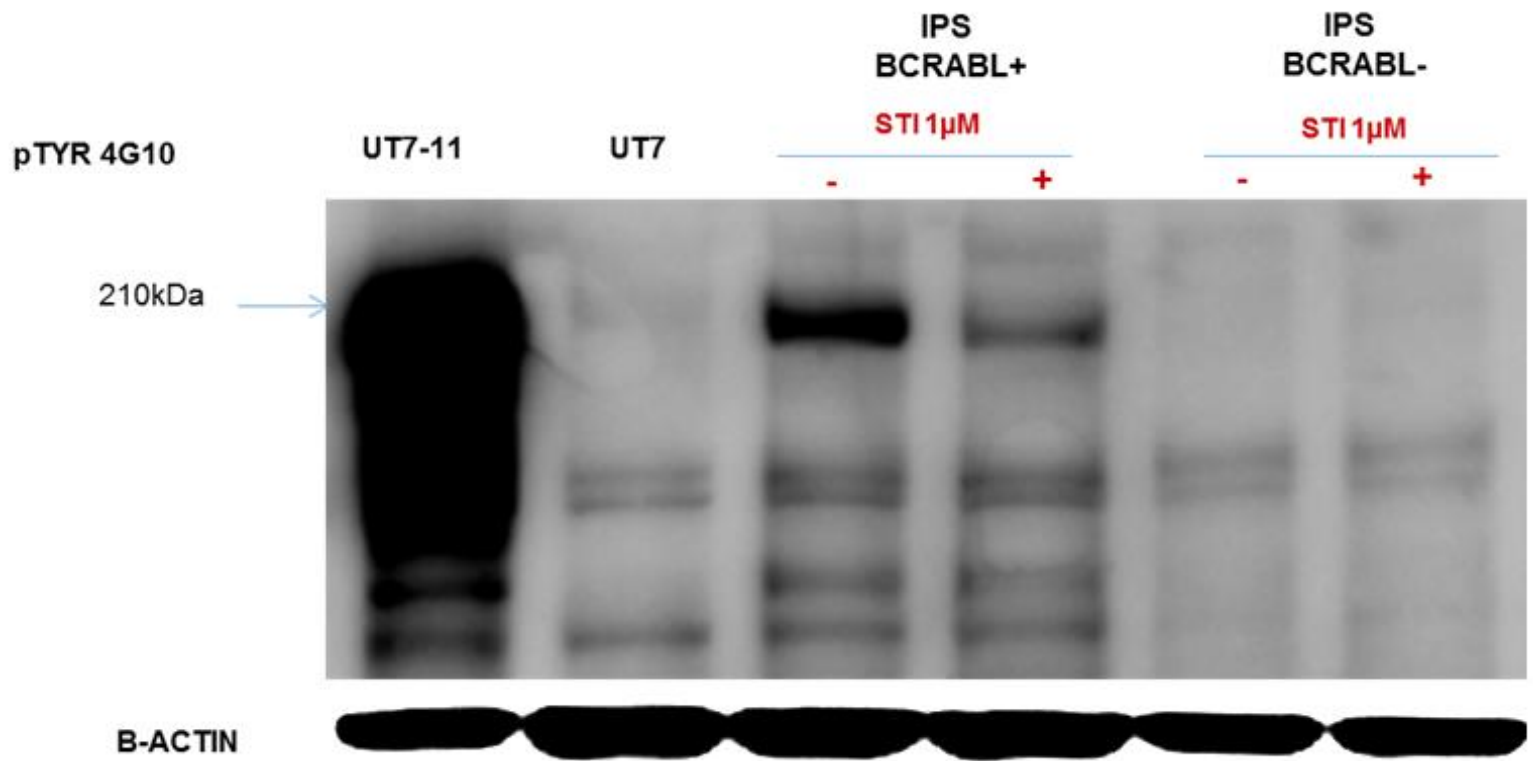


Figure 2B

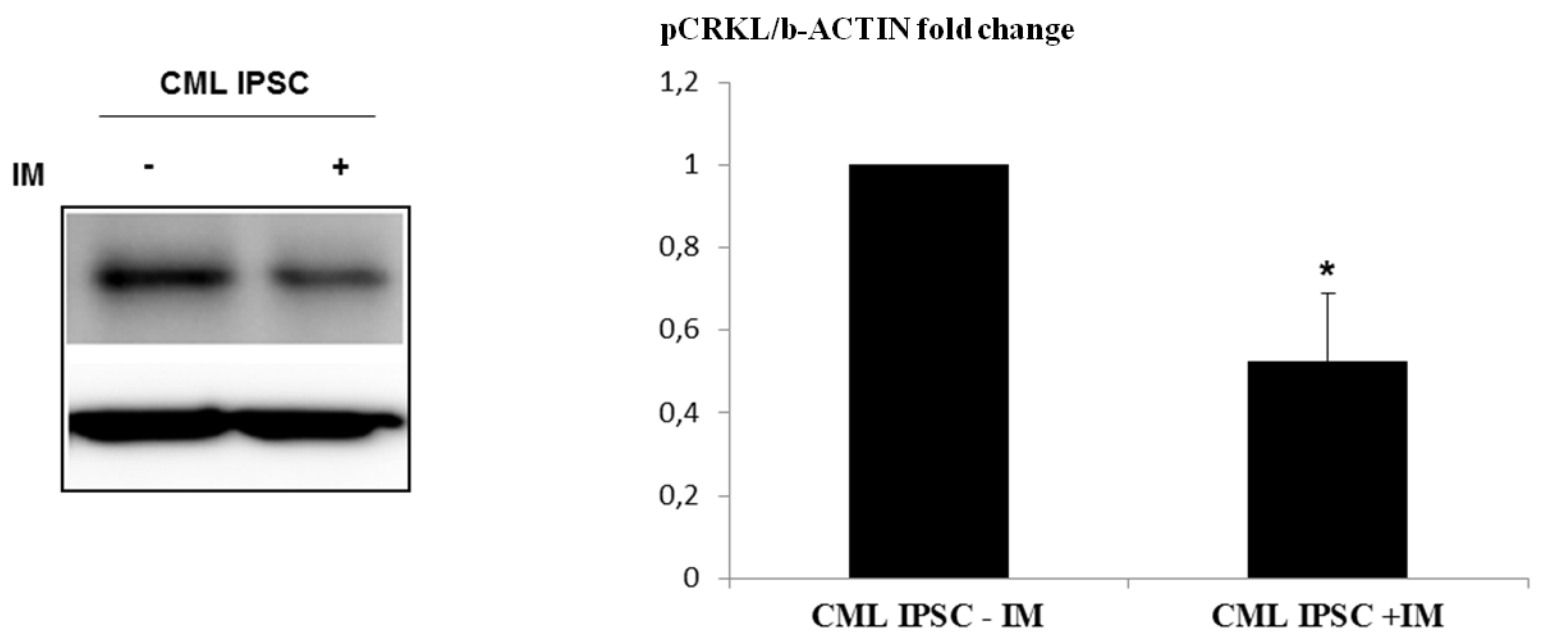


Figure 3A

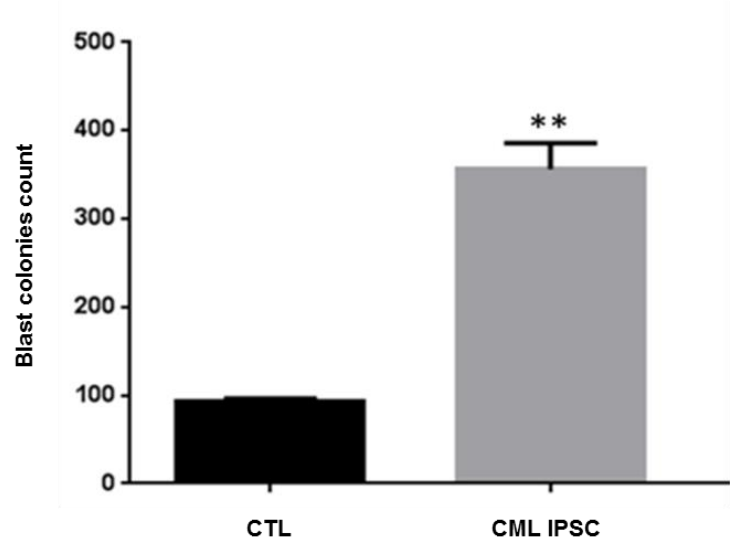


Figure 3B

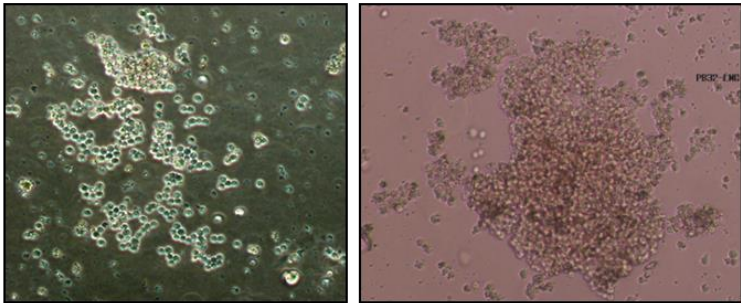


Figure 3C

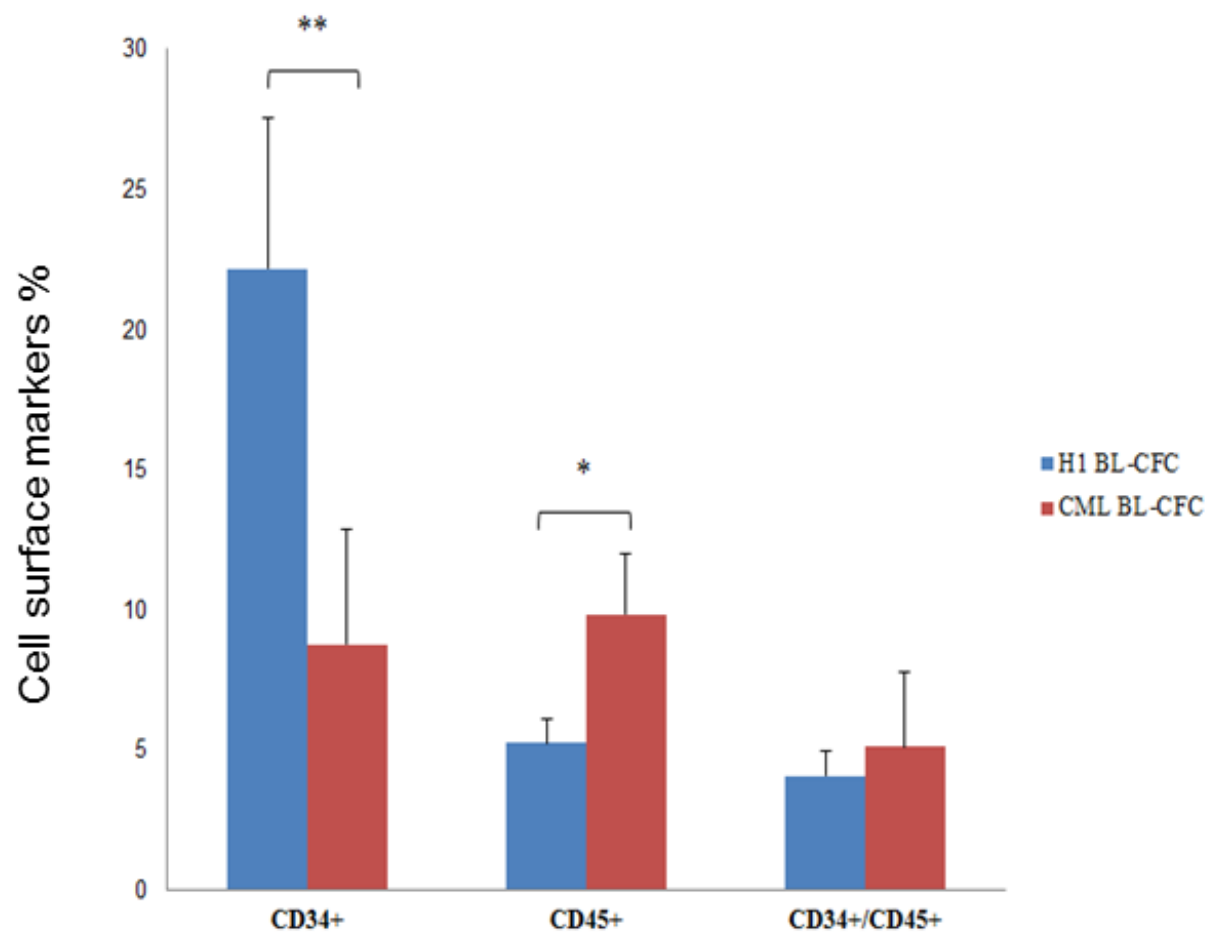


Figure 4A

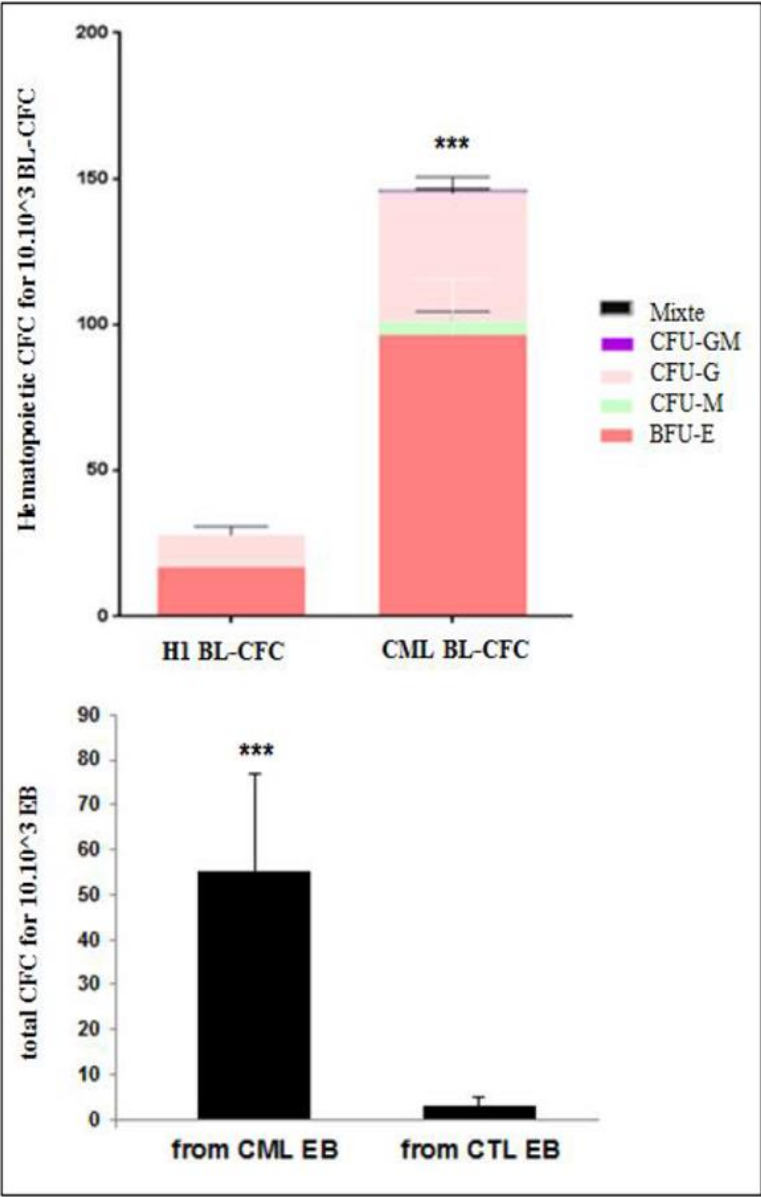


Figure 4B

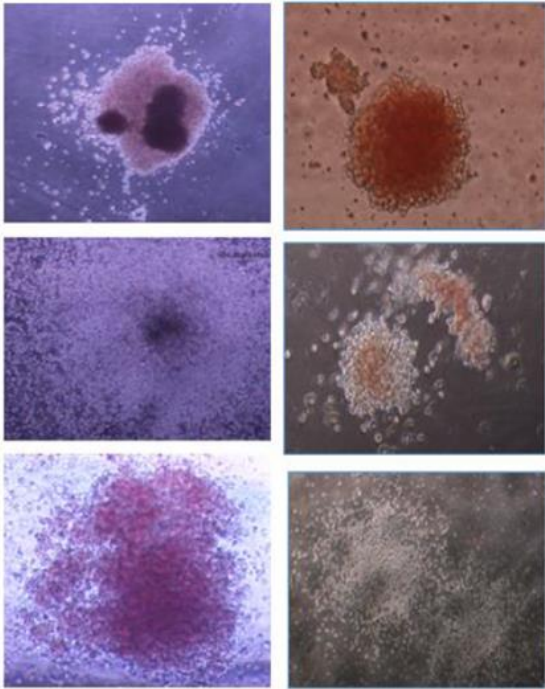


FIGURE 5A

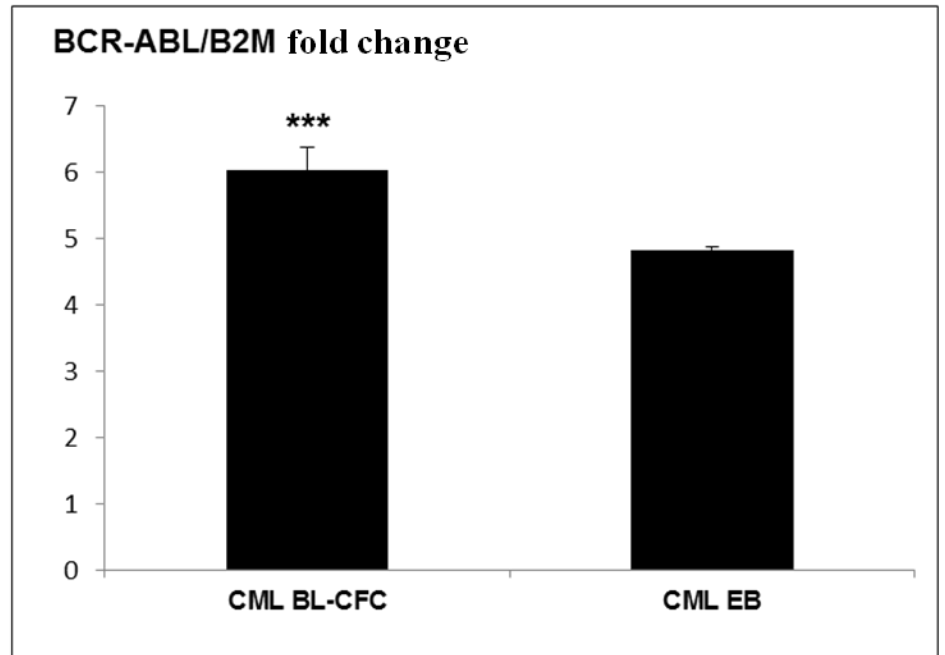
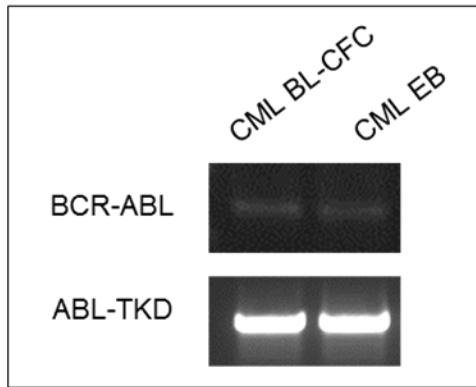
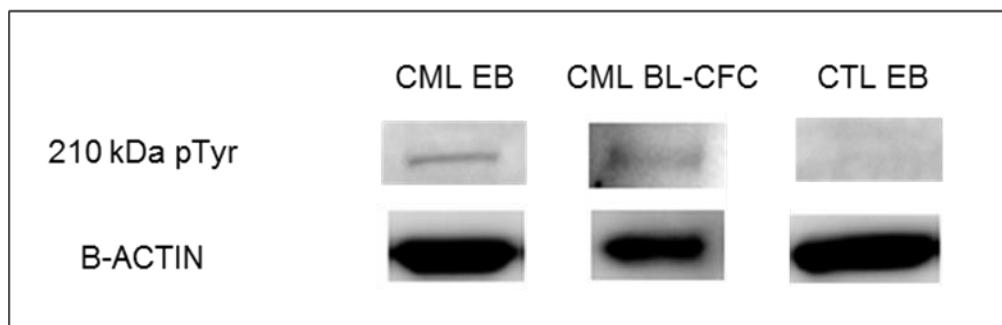


FIGURE 5B



pTyr(p210)/b-ACTIN fold change

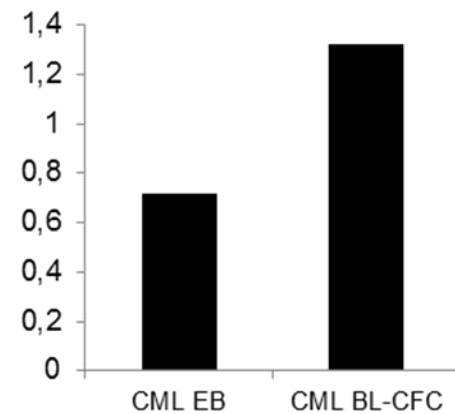


Figure 6A

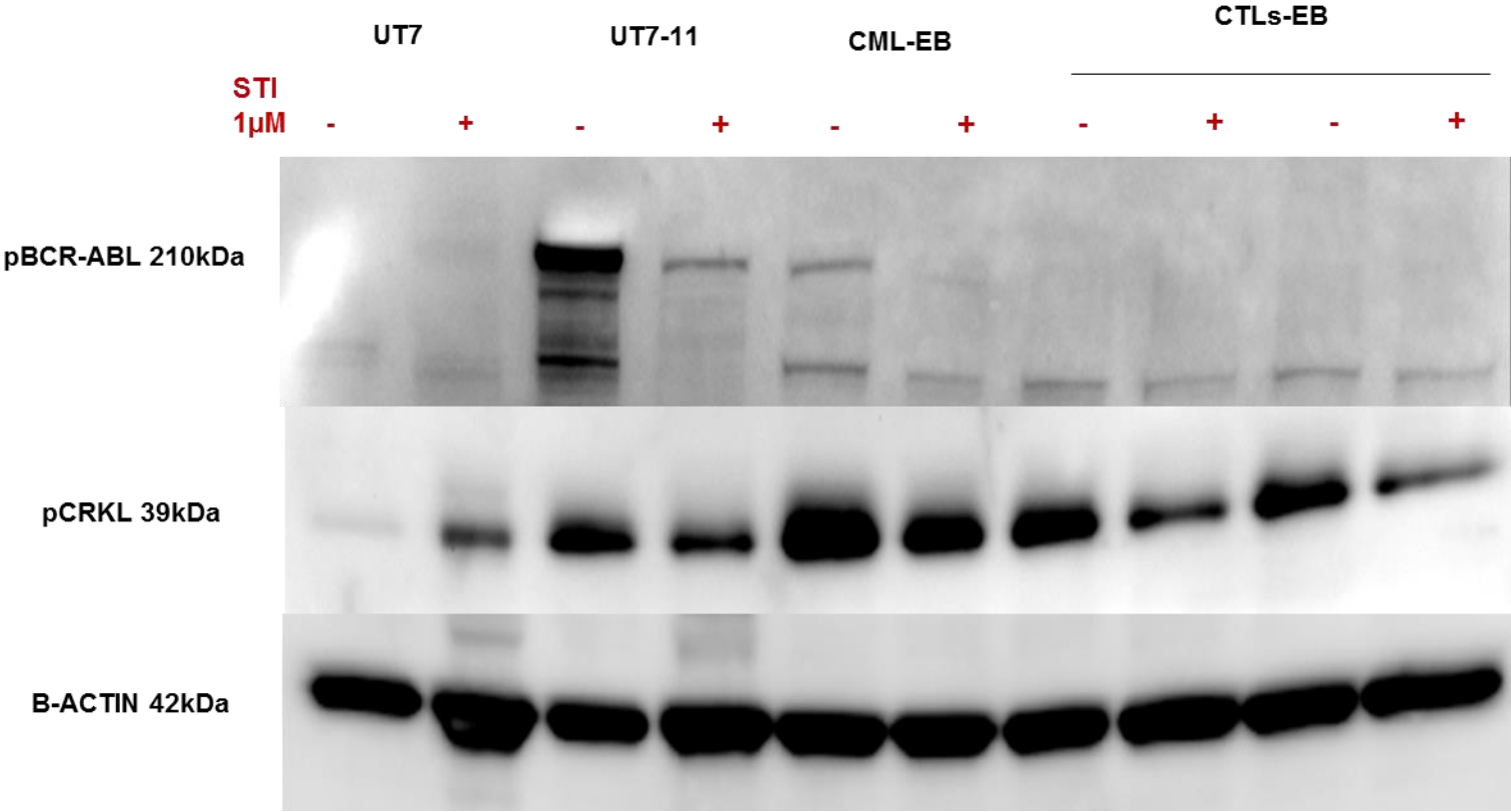


Figure 6B

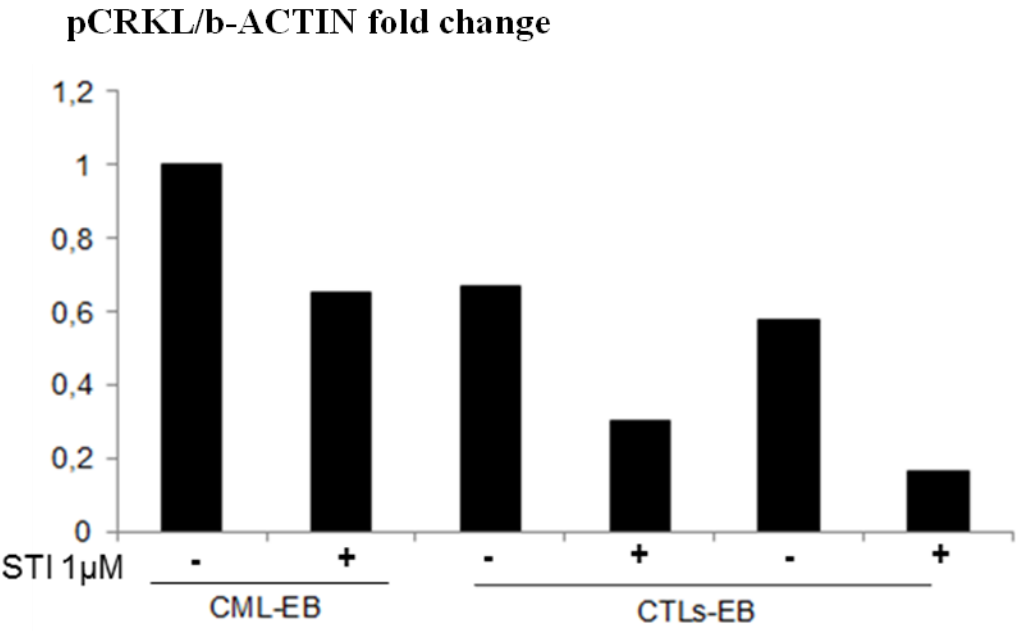


Figure 7

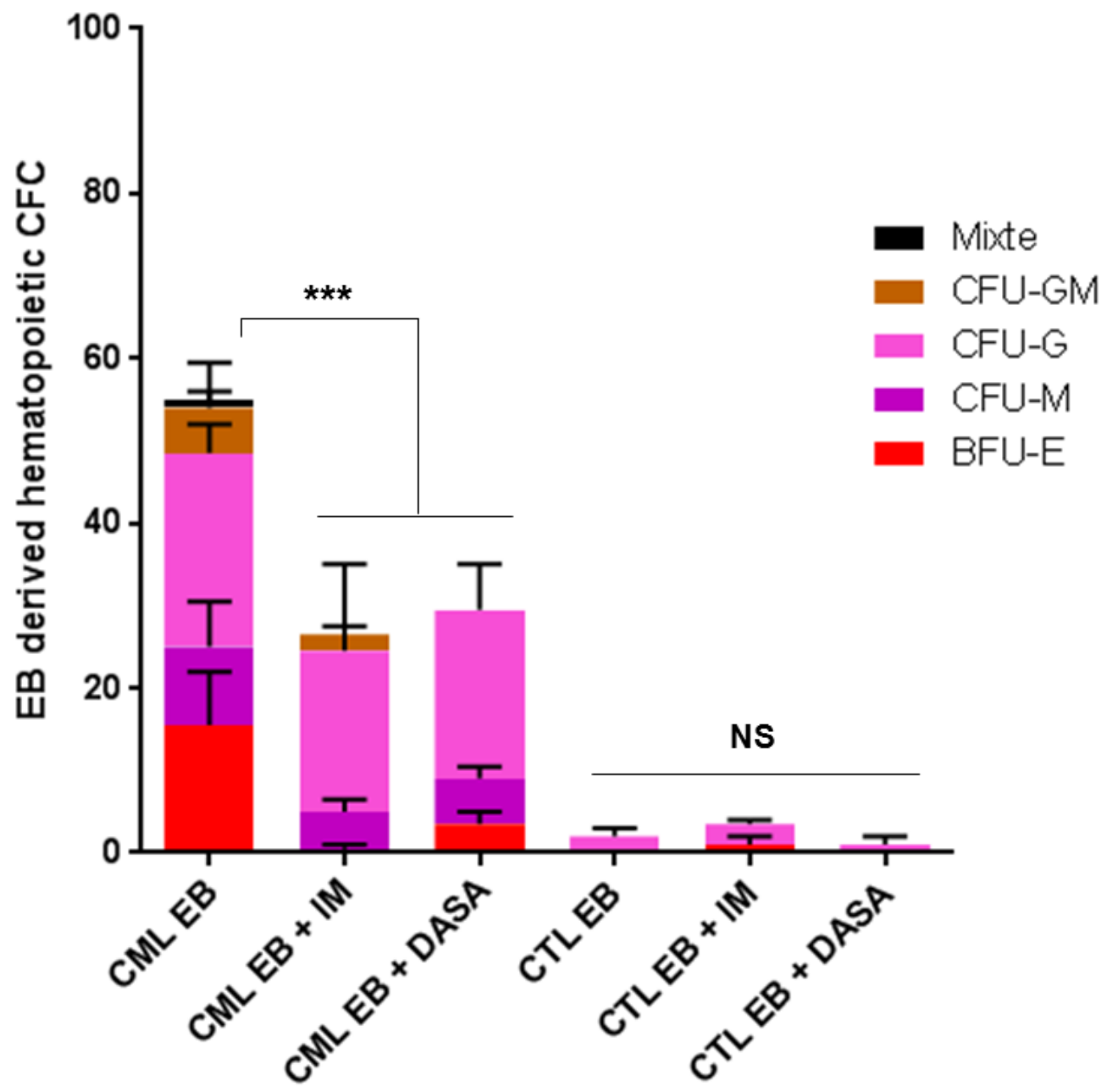


Figure 8

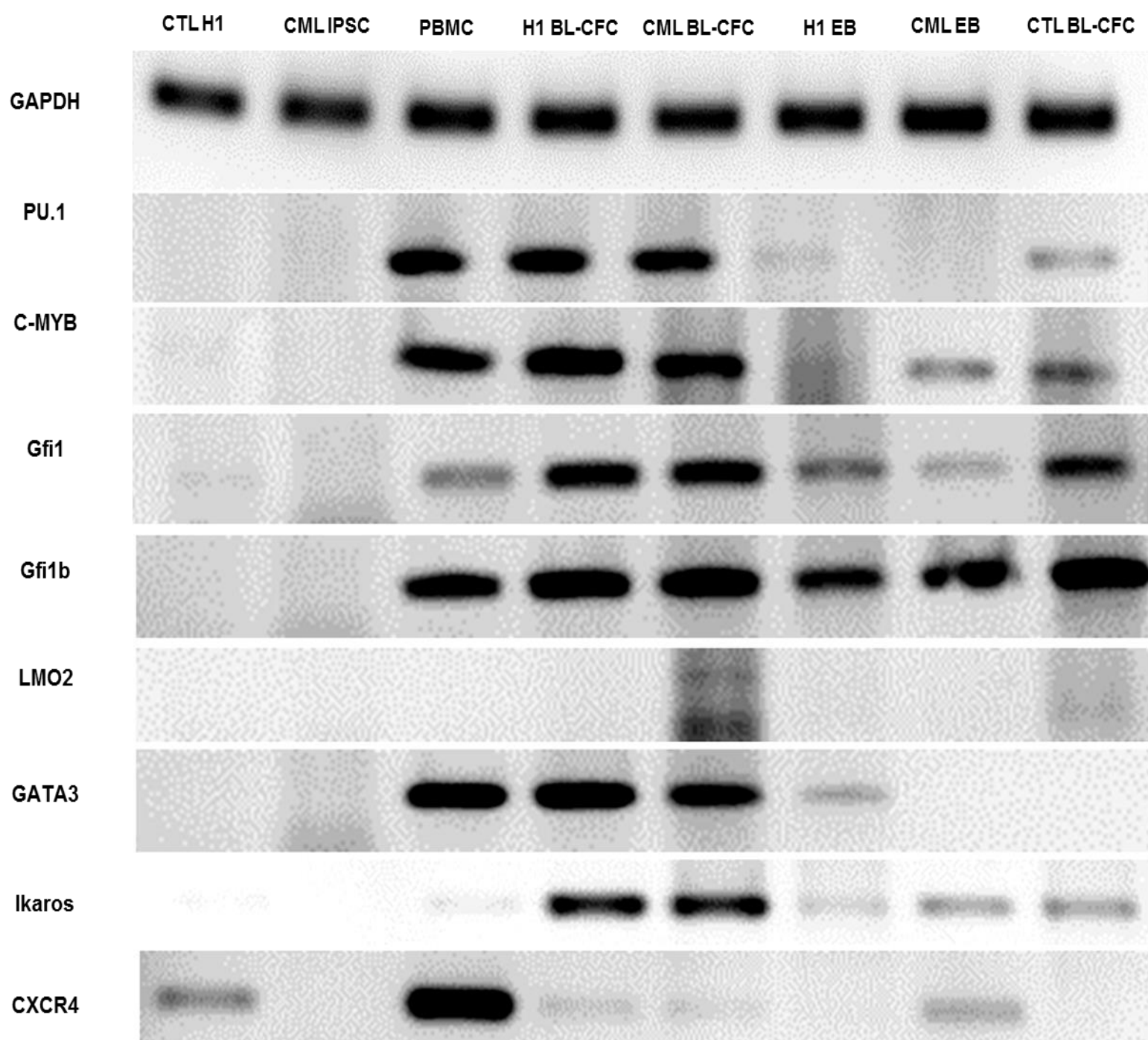


Figure 9A

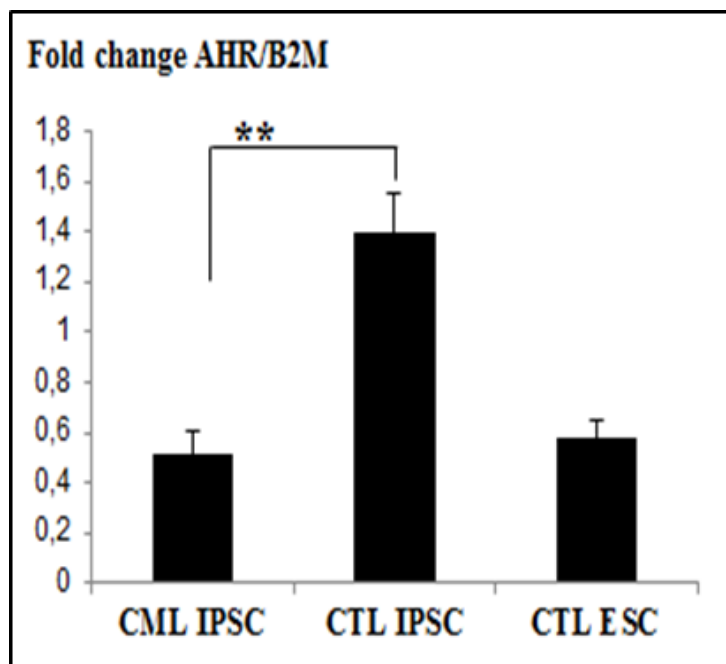


Figure 9B

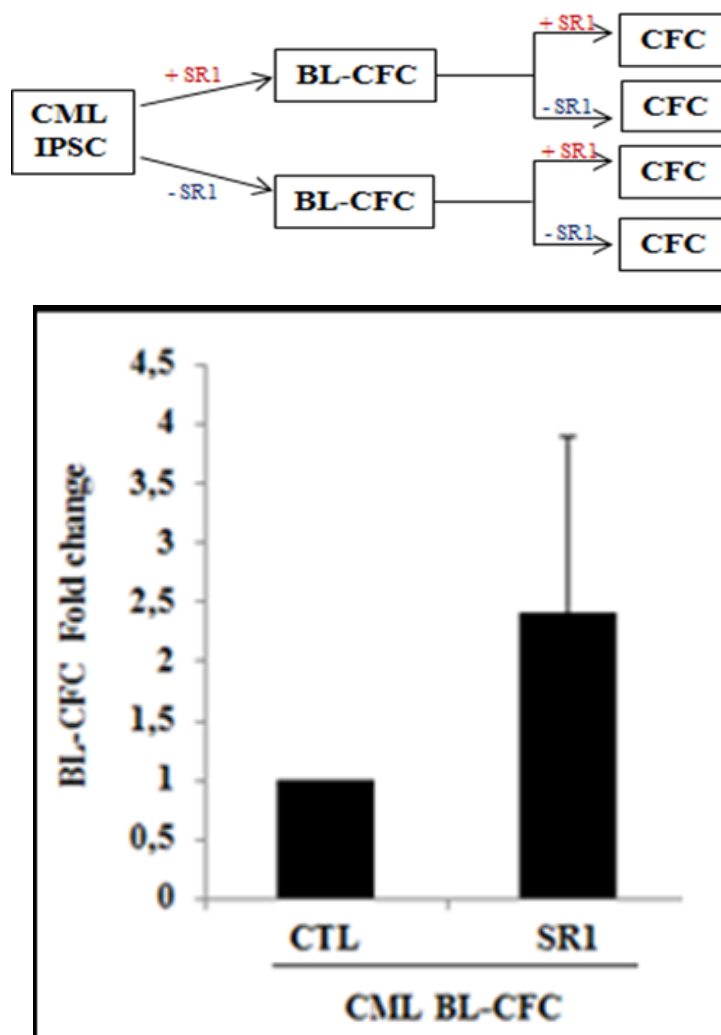
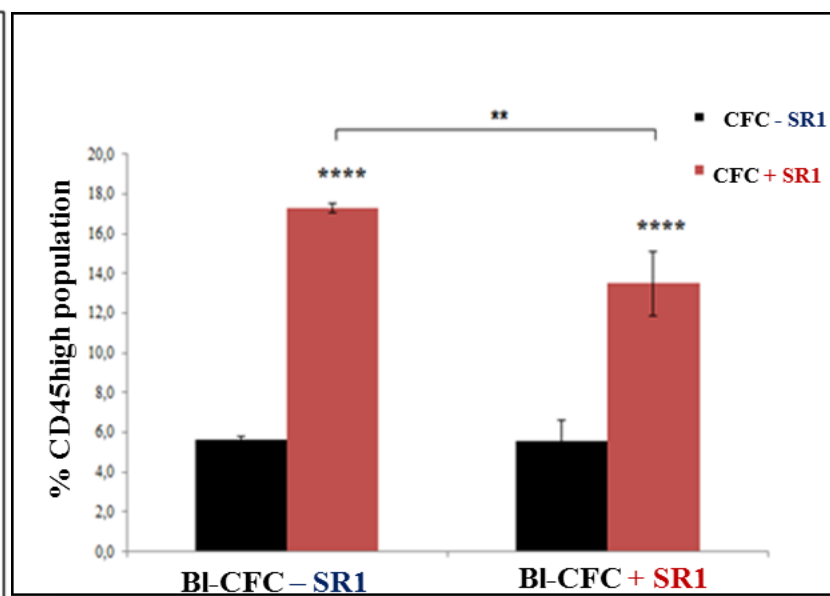
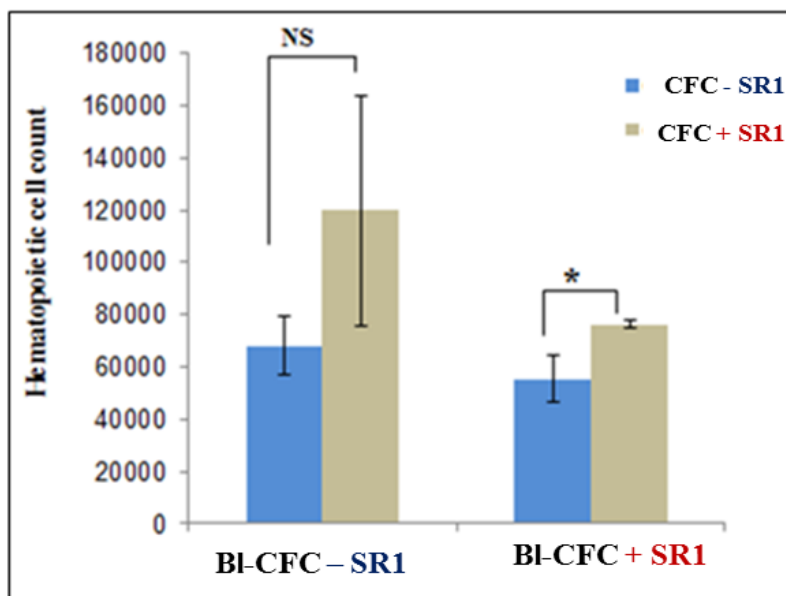
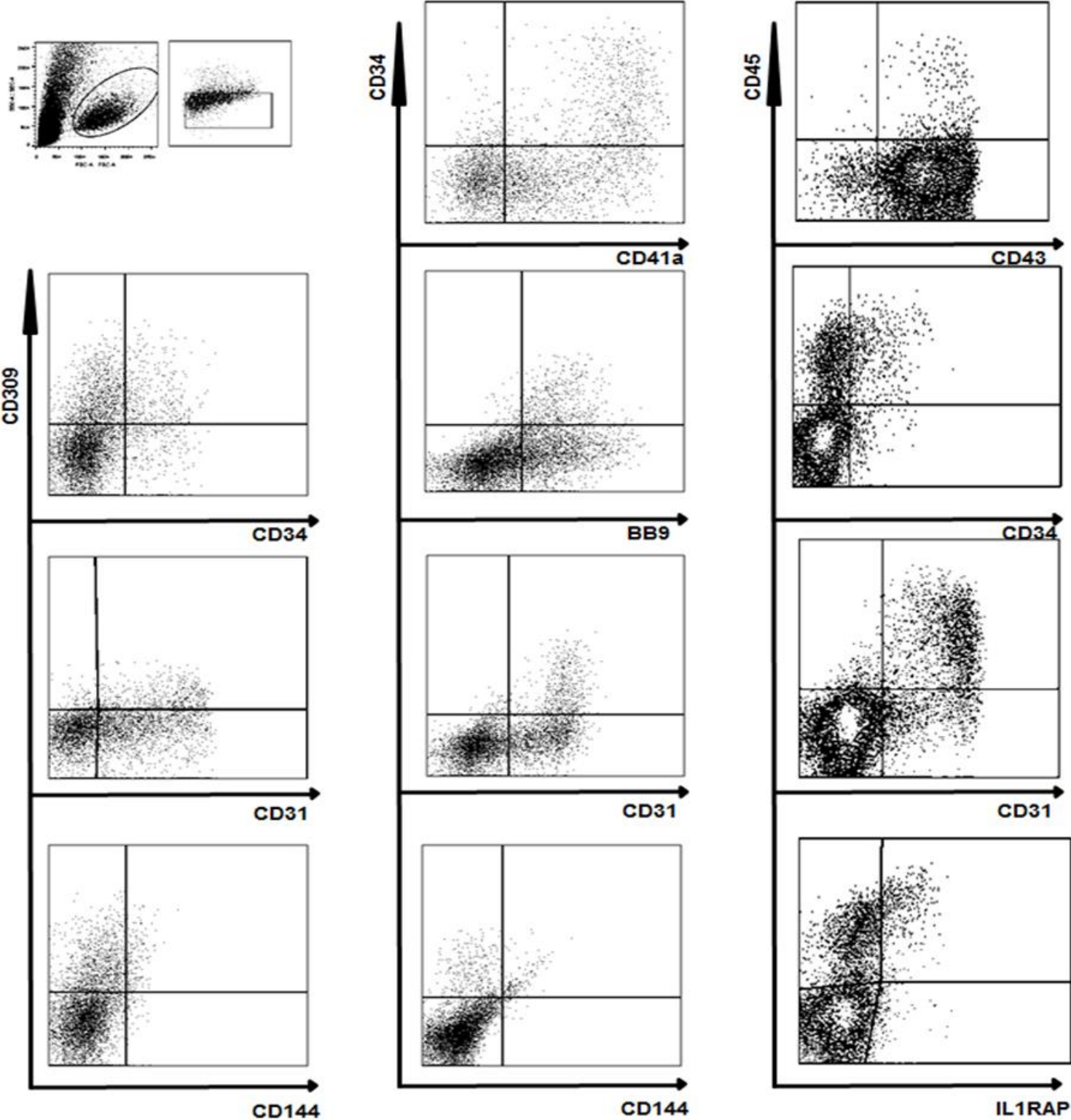


Figure 9C



Supplementary figure 1



Supplementary figure 2

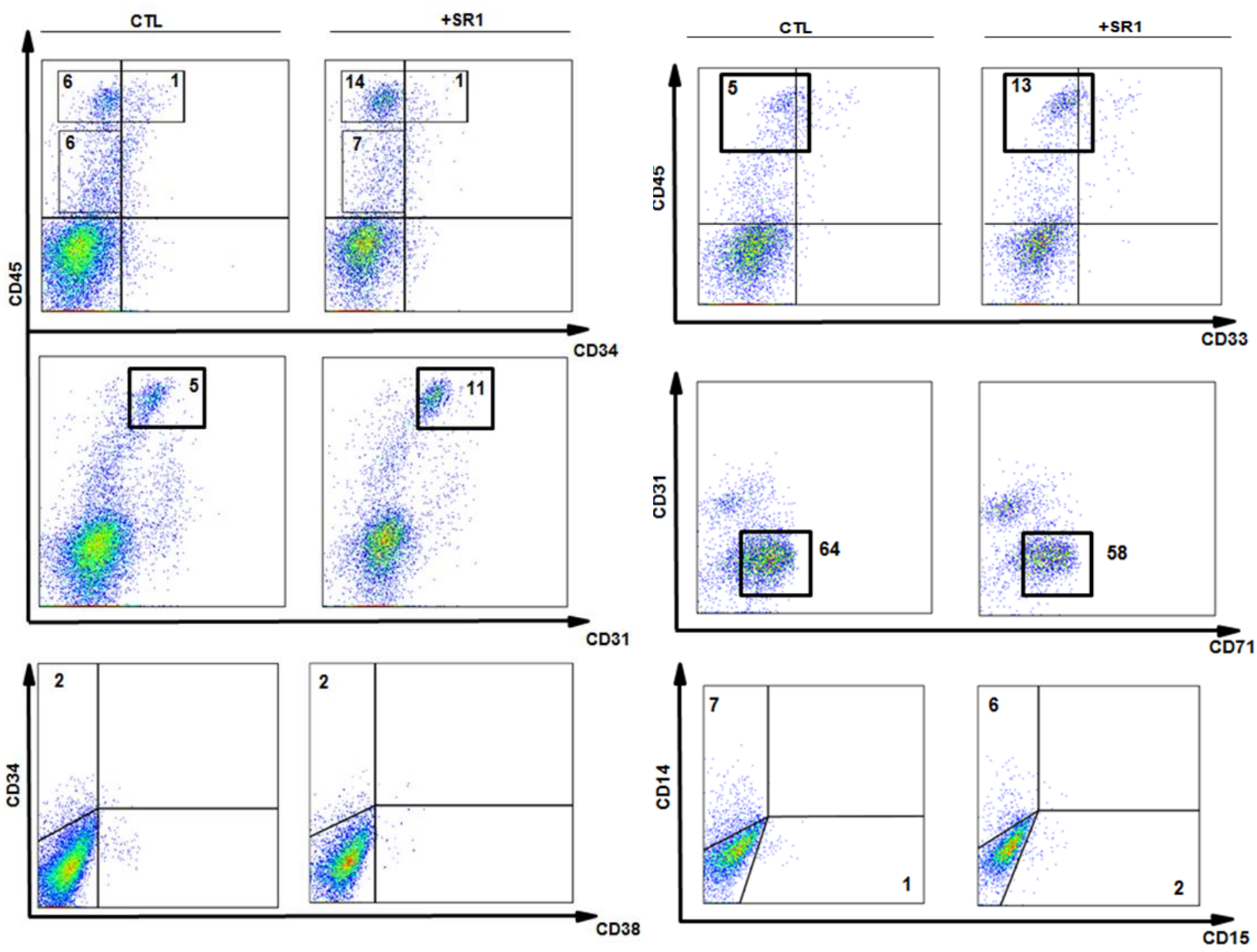


Table 1

	H1 IPS	PB32 IPS	PBMC	BL-CFC from H1	BL-CFC from PB32	EB from H1	EB from PB32	BL-CFC from PB33
LMO2	-	-	-	-	++	-	-	+/-
GFI1	-	-	+/-	++	++	+	+/-	++
GFI1b	-	-	++	++	++	+	+	++
PU.1	-	-	++	++	++	+/-	-	+
GATA3	-	-	++	++	++	+/-	-	-
C-myb	-	-	++	++	++	+/-	+	+
Ikaros	-	-	+/-	++	++	+/-	+	+
CXCR4	+	-	++	+/-	+/-	-	+	-
BCR-ABL	-	+	-	-	+	-	+	-

Table 2

PU.1	(TGCCCTATGACACGGATCTATAC/TCCAACAGGAACTGGTACAGG)
c-MYB	(ATGGGCAGAAATCGCAAAGC/GGTAGCTGCATGTGTGGTTC)
GFI.1	(AAGTGCCACCTGGTCTCCT/CTCAAACCTCCGAGCTCCGTT)
GFI.1b	(CAACAGCCCTGTCCTTAGCA/GGGGTGGAGAAGACCTTGTT)
LMO2	(TGCAGGGCTTGCTAAGGAAT/CCTTTTTCCTGCCTCTCCACTA)
GATA3	(CAGCACAGAAGGCAGGGAG/CGAGCTGTTCTTGGGGAAGT)
IKAROS	(GAATGGGGAAGAATGTGCGG/GGCAGCGCTCTTTATGTTCC)
CXCR4	(GTGACTTTGAAACCCTCAGCG/GAGCCCATTTCCTCGGTGTA)

ARTICLE 3

(En préparation)

**Generation of a blast crisis model in
chronic myeloid leukemia (CML) using patient-specific induced pluripotent stem cells**

ARTICLE 3

Generation of a blast crisis model in chronic myeloid leukemia (CML) using patient-specific induced pluripotent stem cells

La crise blastique est définie par un arrêt de la différenciation des progéniteurs leucémiques en rapport avec une accumulation d'anomalies génétiques lors de la phase chronique de la LMC. Il existe plusieurs outils expérimentaux de crise blastique comme les lignées générées à partir des cellules leucémiques de patients ou des modèles de complémentation de l'oncogène BCR-ABL chez la souris. Cependant, ces modèles ne permettent pas de modéliser tous les aspects de la transformation blastique et notamment ne permettent pas de mimer cette évolution dans un contexte génomique et épigénomique spécifique d'un patient donné sur un mode séquentiel. Dans le but d'explorer la faisabilité de cette progression, nous avons utilisé la lignée iPSC PB32 précédemment décrite (Telliam et al., 2016) en utilisant une approche de mutagénèse par le N-nitroso-N-éthylurée (ENU). Le but de cette approche était l'accentuation de l'instabilité génomique inhérente aux cellules exprimant BCR-ABL et étudier l'évolution cytologique, cytogénétique et moléculaire des cellules hématopoïétiques générées dans les cultures iPSC traitées au long cours par ENU, en comparaison avec la lignée iPSC de LMC non-traitée et d'iPSC témoins traités de la même manière.

Les expériences préliminaires après une exposition à court terme à l'ENU ont montré dans la lignée iPSC de LMC la présence et la persistance d'une phosphorylation de γ -H2AX de manière prolongée par rapport aux lignées témoins. Les cellules ont alors été traitées au long cours (> 60 jours) par ENU, ajouté quotidiennement aux cultures. Après cette exposition longue durée des iPSC à l'ENU, nous avons réalisé des expériences de différenciation hématopoïétique à partir de ces cellules.

Afin d'étudier l'effet de cette instabilité génétique, induite par une exposition chronique à l'ENU, nous avons généré des colonies hématopoïétiques à partir de corps embryonnaires ou de colonies blastiques. Nous avons observé dans un premier temps, une augmentation majeure du potentiel de génération des colonies blastiques. Les tests clonogéniques ont montré une augmentation du potentiel hématopoïétique à partir de colonies blastiques ou à partir des EB. Les analyses cytologiques des cellules qui ont proliféré dans ces cultures ont montré la présence de précurseurs myéloïdes et de blastes indifférenciés réminiscentes de cellules de crise blastique. Sur le plan phénotypique, les cellules étaient à > 90% CD45⁺CD43⁺CD38⁺CD31⁺ mais également avec des sous-populations exprimant des marqueurs comme le CD133, le BB9, le SSEA1 ou encore l'IL1-RAP.

L'analyse cytogénétique comparative des IPS-LMC et contrôle, avec ou sans exposition à l'ENU, a permis de mettre en évidence que les iPSC PB32 traitées par ENU présentaient des anomalies cytogénétiques additionnelles au chromosome Ph1 dont certaines ont été rapportées dans les cellules leucémiques blastiques primaires de patients comme la délétion 9q+ et la délétion du chromosome 21. Enfin, nous avons effectué une analyse plus sensible de CGH array afin d'identifier les altérations génomiques dans les BI-CFCs et les CFC dérivés des EB, produits à partir des IPS-LMC traité par ENU avec pour référence l'ADN génomique de l'IPS-LMC non traité. Après traitement des données, nous avons identifié 249 gènes altérés, avec des pertes et des gains de matériels génomiques. Ces altérations impliquaient des gènes du développement mésodermique, du lignage hématopoïétique, de la réponse aux dommages causés sur l'ADN et également dans la résistance à l'Imatinib. L'implication de certains gènes identifiés a déjà été documentée dans la physiopathologie de la LMC comme IKZF1, SIRT1 ou BLM et d'autres sont connus pour être altérés dans les cancers.

L'analyse croisée avec les données transcriptomiques générées par les travaux de Radich et coll. a permis d'associer 125 des 249 gènes à la progression de la phase chronique à la phase blastique. Enfin, 38 des gènes les plus statistiquement significatifs ont pu être associés à la phase chronique ou blastique et parmi eux, 11 étaient déjà décrits dans la physiopathologie de la LMC (7 dans la phase chronique et 4 dans la phase blastique), la résistance aux ITK ou l'instabilité génomique.

Ces résultats suggèrent donc la faisabilité d'un modèle de progression à partir d'une lignée IPS de LMC permettant d'envisager la possibilité d'identification de nouveaux marqueurs de progression vers la phase aigüe de la LMC et éventuellement pour le test de nouvelles thérapies.

**Generation of a blast crisis model in
chronic myeloid leukemia (CML) using patient-specific induced pluripotent stem cells**

Author names and affiliations:

G. Telliam^{a,b}, C. Desterke, H. Acloque, O. Féraud^{a,b,c}, R. Najar, M. Fontaine-Arnoux, F. Griscelli^{a,b,c}, P. Opolon^d, D. Divers^{a,b,c}, A. Bennaceur-Griscelli^{a,b,c,e}, A.G. Turhan^{a,b,c,e}.

Affiliations:

a- INSERM U935, Université Paris Sud, 94800 Villejuif, France.

b- ESTeam Paris Sud, INSERM U935, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, 94800, Villejuif, France.

c- INGESTEM National IPSC Infrastructure, 94800 Villejuif, France

d- Gustave Roussy, Laboratoire de Pathologie Expérimentale, F-94800, Villejuif, France.

e- Division of Hematology, Paris Sud University hospitals, Le Kremlin Bicêtre 94275 and Villejuif, 94800, France

ABSTRACT

Despite the major progress obtained in prognosis with the use of tyrosine kinase inhibitors (TKI), the great majority of patients with CML remain on long-term therapy and progression occurs in patients with either primary or secondary resistance. The mechanisms of progression towards accelerated phase (AP) and blast crisis (BC) have been studied so far only in primary patient samples in BC. Currently, there is no *in vitro* model to sequentially study the molecular events leading from CP to BC. Indeed, only some primary sequential samples are amenable to analysis. Using induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) technology, it is now possible to reprogram the primary leukemic cells to pluripotency and generate a major source of stem cells. To determine the feasibility of studying progression of CML towards AP and BC, we used a patient-specific iPSC line that we have generated from the primary leukemic cells of a patient, who later showed a TKI-resistance requiring an allogeneic stem cell transplant. These iPSC expressed BCR-ABL, exhibited all pluripotency markers and after injection in NSG mice, generated teratoma with differentiation into three germ layers. In hematopoietic differentiation assays using day 19-embryoid bodies (EB), increased numbers of hematopoietic progenitors were found as compared to control iPSC (5-fold increase $n=3$). We have then treated leukemic iPSC with the mutagenic agent N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) during regular medium changes. After 61 days in ENU cultures, day-19 derived embryoid bodies generated hematopoietic cells (>90% CD45+, CD43+) which proliferated in liquid cultures with myeloid and some blast cell morphology. Cytogenetic analyses of iPSC revealed chromosomal abnormalities such as loss of Y and loss of der q9+, both alterations are known to occur in CML during the progression. They exhibited increased numbers of micronuclei (MN) as compared to leukemic iPSC without ENU (X 3Fold increase), suggesting

acquisition of a progressive chromosomal instability. CGH array analyses were performed using ENU-treated iPSC-derived hematopoietic cells in two different time points as compared to leukemic iPSC cultured without ENU. Genomic aberrations were analyzed by Agilent Cytogenomics software with Mosaicism workflow on HG19 genome. 249 gene loci alterations were detected after polymorphism filtration on European population. These analyses showed DNA losses and DNA gains in genes implicated in mesoderm development and hematopoietic lineage as well as genes implicated in DNA damage response. Several loci of transcription factors were found to be involved, such as IKZF1 described in imatinib-refractory chronic myeloid leukemia (Bolton-Gillespie et al., 2013). The aberrations included SIRT1 and BLM which is implicated in DNA repair. Several cancer genes were found to be involved, some known to be altered in leukemia (BLM, IKZF1, NCOA2, ALK, EP300, ERG, MKL1, PHF6 and TET1). Remarkably, transcriptome geodataset GSE4170 (Radich et al., 2006) allowed us to associate 125 of 249 of the aberrations that we detected in CML iPSC, with the CML progression genes already described during progression from chronic and AP to BC (p-value = 9.43×10^{-32} , after ANOVA with 1000 permutations). 38 most predictive aberrations allowed a perfect reclassification of BC and chronic phase samples by unsupervised classification. Among these candidates, eleven of them have been described in CML physiopathology and connected to TKI resistance and genomic instability. Majority of them (7/11) are connected to chronic phase (FAS, ACTB, TRIM21, ANPEP, MLK1, CSF2RA, and MAGEC2) whereas minorities of them (4/11) are connected to BC (ACP1, SH3YL1, FHL1, and IL3RA). Interestingly, these experiments also allowed us to discover the connection of a new multidrug resistance molecule associated to BC and having the ability to modify interferon pathway connected to the TKI sensitivity. Thus, genomic instability pattern that we have generated using a single leukemic iPSC allowed duplications of genomic abnormalities described in CML progression and allowed identifications of some novel genes. Overall, these results demonstrated that we have generated, for the first time to our knowledge, an

in vitro BC model reproducing genomic events described in patients with BC. This “blast crisis in a dish” tool using patient-derived iPSC will be of major interest to study CML progression and eventually to test new therapies.

INTRODUCTION

Chronic myeloid leukemia (CML) is the prototype of a clonal malignancy of the hematopoietic stem cell (Sloma et al., 2010). The initiation of the disease by the appearance of Ph1 chromosome in a very primitive hematopoietic stem cell is followed invariably by the progression of the clone by acquisition of novel abnormalities leading to clonal progression, accelerated and blast phases of the disease (Kantarjian, 1987). This natural history has now been modified by the use of tyrosine kinase inhibitors (TKI) as first line therapies ensuring, in patients with deep molecular response, prolongation of their survival on therapy (O'Brien et al., 2003). However, resistances to several lines of TKI occur, and accelerated and blast phases are observed, potentially due to clonal selection by TKI therapies (Shah et al., 2002; Soverini et al., 2006). Using serially collected patients samples, seminal and now classical work have established main cytogenetic and molecular events observed during the progression of the disease towards accelerated and eventually blast phase. These include cytogenetic abnormalities identified as “major” and “minor” routes (Crisan et al., 2015; Mitelman, 1993). Several works performed using patients samples and models have also identified, during the last two decades, major molecular events involved in this progression such as TP53 mutations (Perrotti et al., 2010). BCR-ABL expressing cells are also prone to develop a mutator phenotype (Canitrot et al., 1999) which could be due to the presence of an increase oxydative stress (Koptyra et al., 2008) which lead to clonal selection under the influence of TKI therapies (Liu and Wang, 2015). CML cells are finally doomed by the deficiency of several DNA repair mechanisms involving DNA-PKcs (Deutsch et al., 2001) BRCA1 (Deutsch et al., 2003) as well as abnormalities of specific DNA repair genes such as Bloom (Slupianek et al., 2005) and other repair mechanisms such as NER (Canitrot, 2003) or

MMR (Stoklosa et al., 2008). Blast crisis is defined by a differentiation arrest decision of the leukemic progenitors and insensitivity to TKI. This alteration of the differentiation is due to this accumulation of genetic abnormalities.

iPSC technology offers the possibility to obtain unlimited numbers of pluripotent cells, which despite difficulties of inducing definitive hematopoiesis (Lerou and Daley, 2005), can be used for modeling some aspect of the hematopoiesis. However, the induction of a blast crisis model using iPSC-derived cells remain problematic as there is no data showing that an iPSC can be generated from a blast crisis patient. In order to explore the possibility of generating such model from an iPSC derived from a CP-CML patient, we have chosen an *in vitro* mutagenesis approach using N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). Here, we show that CML patient derived IPSC can be used to generate a model of leukemia, mimicking cytological and genomic patterns of genomic instability observed in primary blast crisis cells. Moreover, we show that genomic abnormalities revealed in this way are representative of those described in large database of blast crisis genomic abnormalities using primary leukemic cells.

MATERIALS AND METHODS

Patient-derived iPSC and characterization.

Generation of CML iPSC PB32 has been previously described (Telliam et al., 2016). Briefly, peripheral blood cells were obtained at diagnosis from a 14-year old CML patient with informed consents according to the declaration of Helsinki. This patient was treated with Imatinib mesylate as a first line therapy. At 12 months post-therapy there was no major molecular response and an allogenic bone marrow transplant was performed. The patient remains in complete remission since the transplant performed in 2004. To generate iPSC, cryopreserved CD34+ cells were used as previously described (Telliam et al., 2016). All analyses were performed using a polyclonal stock of iPSC. Control cells used for these experiments included PB33, an iPSC cell line that was obtained from bone marrow CD34+ cells using Sendai virus. CML and control iPSC have been characterized for their pluripotency using cell surface markers as well as by generation of *in vivo* teratoma assays in immunodeficient mice (Telliam et al., 2016).

iPSC and ESC cultures.

hIPS cell lines were maintained on the mitomycin-C-inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells with DMEMF12 supplemented with 0.1mg/ml bFGF, with or without N-ethyl-N-nitrourea 10µg/ml or 50µg/ml and treated 2h with 1mg/ml Collagenase type IV (Gibco by life technologies ref 17104-019).

Embryoid body assays.

To induce embryoid body (EB) formation, ES and iPS cells at day 6–7 after cell passage, were treated with collagenase IV. Clumps were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Invitrogen) supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 1 mM L-glutamine, 15% fetal calf serum (FCS, Invitrogen), 450 μ M monothioglycerol, 50 μ g/mL ascorbic acid (Sigma Aldrich) and 200 μ g/L transferrin (Sigma Aldrich) and supplemented with hematopoietic cytokines: 100 ng/mL stem cell factor (SCF), 100 ng/mL fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3L) and 50 ng/mL thrombopoietin (TPO) (all from Peprotech). ES and IPS derived EB were cultured in ultra-low attachment 6-well plates (Costar) for 16 days. Media was changed two or three times depending on EB proliferation. All cultures were incubated at 37°C in 5% CO₂

Blast-colony forming assays.

Blast colony forming cell (Bl-CFC) assays were performed using iPSC cell pellets resuspended in Stemline II Hematopoietic Stem Cell Expansion medium (Sigma-Aldrich S0192) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and L-glutamine, 50ng/ml rhVEGF (Peprotech) and 50ng/ml rhBMP4 (Peprotech). After 48h we added 20ng/ml of rhSCF (Peprotech), rhTPO (Miltenyi Biotec) and rhFLT3L (Peprotech). The embryoid bodies at day 3.5 were collected, dissociated with pre-heated stable trypsin replacement enzyme TrypLE Express (Gibco by Life Technologies ref 12605-10) and filtered with 40 μ m Nylon Mesh sterile cell strainer (Fisher Scientific). Cells were resuspended in Stemline II Hematopoietic Stem Cell Expansion medium (Sigma-Aldrich S0192) supplemented with 1% penicillin-streptomycin and L-glutamine, 50ng/ml rhVEGF, rhBMP4, rhFLT3L and rhTPO, 20ng/ml FGFb (Peprotech) and 5Units/ml EPO (Peprotech) and transferred in Methocult SF H4436 (Stem cell technologies) for 5 to 7 days.

Hematopoietic differentiation.

CFC assays from ES and iPS cells from EB or BL-CFC were plated at 10×10^3 cells/mL into MethoCult GF (H4435 StemCell Technologies). Hematopoietic CFC was counted at day 19.

Western Blots.

Cells were lysed in ice with RIPA buffer containing (NaCl [200mM], Tris [pH 8; 50mM], Nonidet P40 [1%], acide deoxycholate [0.5%], SDS [0.05%], EDTA [2mM]) supplemented with 100 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1mM sodium fluoride (NaF), 1mM orthovanadate (Na_3VO_4). Separation of proteins was done by electrophoretic migration on a 3-8% polyacrylamide gel under denaturing conditions. The proteins were then transferred in a semi-liquid condition on PVDF membrane pre-activated in methanol. After saturation with TBS Tween 5% BSA for 1h and hybridization of the membranes with primary (Anti-phosphoHistoneH2A.X (Ser139) clone JBW Millipore) and secondary antibodies coupled to HRP. Membranes were revealed by chemiluminescence with SuperSignal West Dura or Femto reagents and data acquired using G:BOX iChemi Chemiluminescence Image Capture system.

Evaluation of hematopoietic cells phenotypes.

At day + 19 of cultures, the methylcellulose was washed with PBS. Living cells were counted in trypan blue and stained with the following antibodies in PBS 4%BSA at 4°C 45 min: CD45Pe-Vio770 (Miltenyi), CD34Vioblue (Miltenyi), CD41aPE (BD), CD43FITC (Miltenyi), CD31FITC (Beckman Coulter), CD235aAPC (BD), IL1-RAP APC (R&D), CD38PE (Miltenyi), CD71PE (BD), CD14FITC (Beckman Coulter), CD33APC (BD), CD133APC (BD), BB9PE (BD),

SSEA1PE (BD). After 1h, cells were washed and resuspended in PBS 4%BSA with viability staining reagent 1µg/ml (7-AAD) 7-aminoactinomycin D (Sigma Aldrich). Stained cells were analyzed with a MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec) flow cytometer and Flowjo analysis software.

ENU experiments.

CML iPSC and control iPSC cells were cultured in the presence or in the absence of ENU as described above. Experiments performed used iPSC cultured in ENU for either 40 days or 61 days. CGH array experiments were performed using EB's derived hematopoietic cells and Bl-CFC generated from ENU-treated cultures as compared to cultures not treated with ENU.

For kinetic analysis, we recovered IPSC colonies on mouse embryonic fibroblasts (MEF). The "clumps" of colonies have been incubated in DMEMF12 medium supplemented with 50µg/ml ENU at 37 ° for 2, 10 and 30 min. After treatment, the protein pellet was extracted from each condition in order to perform a kinetic analysis of the level of γ H2AX by Western blot.

DNA Extraction.

iPSC, EB's and Bl-CFC obtained from either ENU-treated or not treated CML iPSC as well as from control iPSC were used for DNA extraction using standard methods with DNeasy Kit (Qiagen).

Array Comparative Genomic Hybridization

To perform CGH arrays, we have used genomic DNA from ENU-treated iPSC derived EB's and Bl-CFC's compared to CML iPSC without ENU treatment. We followed Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis protocol. Briefly, we performed digestion from

500ng of DNA with SureTag DNA labeling kit (4-packs). After gDNA amplification CML iPSC was labeled with Cyanine 3 and the tested samples with Cyanine 5. Assembled chambers were loaded into the oven rotator rack, hybridization were performed at 67°C for 24 hours at 20 rpm.

Transcriptome dataset

Rosetta / Merck Human 25k v2.2.1 microarray Array data matrix of normalized log ratios from GSE4170 was downloaded on Gene Expression Omnibus website: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE4170>), and annotated with annotation platform GPL2029 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL2029>). In this dataset CD34+ cell samples belonging to the 3 experimental groups corresponding to the different evolution phases of chronic myeloid leukemia were analyzed: chronic phase, accelerate phase and blastic crisis were analyzed (Radich et al., 2006).

Bioinformatics

Boxplot, two-sided Student t.test with Welch correction were performed in R Software version 3.2.3. Heatplot was performed with made4 package (Culhane et al., 2005). Functional enrichment was performed with Go-Elite Standalone software version 1.2 on the Gene Ontology Biological Process, KEGG and CommonsPathway databases included in Homo sapiens EnsMart77Plus (Ensembl – Biomart) update (Zambon et al., 2012). Functional interaction networks were performed with Cytoscape software version 3.2.1 (Cline et al., 2007). Unsupervised principal component analysis was performed on gene expression profile with R package FactoMiner; p-value was calculated by group discrimination on first principal component axis. Pubmed gene prioritization was realized with gene valorization web application (Brancotte et al., 2011). Circosplot on contingency

table of Pubmed gene prioritization was realized with Circlize R package (Gu et al., 2014). Circosplot of genomic aberrations with HG19 coordinates were performed with OmicCircos R package (Hu et al., 2014). ROC curves were performed with ROCR R package. Genomic aberration gene candidates were also matched with important databases such as: database PLURINET for genes implicated in pluripotency (Müller et al., 2008), cancer genes COSMIC database: Catalogue of somatic mutations in Cancer (<http://cancer.sanger.ac.uk/census>) (Futreal et al., 2004) and transcription factors (Vaquerizas et al., 2009).

Cytogenetic analyses

Caryotype analyses were performed using cell pellets collected at different time points using standard methods as previously described (Telliam et al., 2016).

RESULTS

Hematopoietic potential CML iPSC

We first determined, using hematopoiesis induction experiments, the ability of CML iPSC PB32 (designed hereafter as PB32) and PB32 exposed to ENU for 2 months (designed hereafter as PB32-ENU) to generate hematopoietic cells. Hematopoiesis was induced either from day 16 EB or day 7 BL-CFC using both cells. As shown in figure 1, PB32 EB generated high numbers of CFC as compared to H1 control cells (**Figure 1A**) or PB33 iPSC (Data not shown). These results strongly suggested that the leukemic iPSC expressing BCR-ABL were able to generate a myeloproliferative phenotype *in vitro*. We then wished to determine the hematopoietic potential and phenotype of PB32-ENU iPSC after ENU exposure.

Long term ENU exposure induce CML-IPSC derived hematopoietic cell proliferation

We have developed an experimental approach based on chronic exposure of IPSC to ENU. To this purpose, we compared EB or BL-CFC and hematopoietic cells from CFC assay derived from IPSC cultured under normal IPSC condition or ENU exposed (**figure 1B**). After 2 months of ENU exposure, CML-IPSC showed a significant increase of hematopoietic cell potential (Mann-Whitney $p=0,0006$) (**figure 1B**). Interestingly, in CFC assays generated from PB32-ENU cells, we have observed larger colonies which proliferated in methycellulose cultures (**Figure 2A**) as well as in liquid cultures in the presence of hematopoietic growth factors (SCF, TPO, Flt3L). Cytological features of these cells revealed using May Grunwald Stains, the presence of myeloid

cells with precursor and mature (myelocytes, metamyelocytes, neutrophils, monocytes/macrophages) as well as undifferentiated blast cell morphology reminiscent of accelerated or blast crisis cells (**Figure 2B**). FACS analysis of these cells showed that the majority of cells expressed CD45, with positivity of CD31, CD38 and CD43 markers (**Figure 3**). Hemangioblast marker BB9, as well as CD133, CD26, SSEA1, CD13, CD33 and CD71-expressing cells were also detected (**Supplementary figure 1**).

Genomic instability of CML-IPSC induced by BCR-ABL under ENU exposure.

Differences observed in the behavior of PB32 and PB32-ENU cells suggested that ENU could enhance the DNA repair abnormalities known to be inherent to CML cells. We have performed for this purpose a short term exposure to ENU of our CML iPSC and analyzed the kinetics of accumulation of phospho-H2AX in these cells.

We cultured IPSC colonies on mouse embryonic fibroblasts (MEF). The "clumps" of colonies were incubated with ENU at 37 ° for 2, 10 and 30 min. After treatment, the protein pellet was extracted from each condition in order to perform a kinetic analysis of the level of γ H2AX (**Figure 4A**). Kinetic analysis of an IPSC control cell line; revealed an increase of γ H2AX expression level at 10 minutes of treatment with ENU with a progressive decrease over time. These observations suggest that ENU induces time dependent DNA breaks and that the DNA repair system is set up around 10 minutes after detection of γ H2AX signal. However, CML-IPSC cell line showed a gradual accumulation of γ H2AX (**figure 4B**) with a significant increase after 10 min and persistence of the phosphorylation after 30 min of ENU treatment (n=3 independent experiments, Two way ANOVA with Bonferroni's correction) (**figure 4C**). These results

suggested the presence of a baseline increase of double strand breaks in CML iPSC which persisted after ENU exposure potentially due to a deficient DNA repair system.

We then wished to evaluate the presence of other features of cytogenetic and genomic abnormalities in PB32-ENU cells as compared to PB32 not treated with ENU. To this purpose, we performed cytogenetic analyses on CML iPSC after long-term exposure to ENU (PB32-ENU) as compared to PB32 cultured without ENU. Several cytogenetic abnormalities were identified in addition to t(9;22) (**Table 1**). Amongst these abnormalities (64 mitosis analyzed), we noted the deletion of der 9q (3 mitosis / 64) (5%) and the deletion of chromosome 21 (5 mitosis / 64) (8%) (**Table 1 and Supplementary Figure 2**). To determine the genomic events at the molecular level, we performed CGH array experiments by comparing EB derived CFC and BI-CFC DNA generated from PB32-ENU as compared to PB32 cultured without ENU. Interestingly, we observed in PB32 cells, grown with ENU, the presence of cytogenomic abnormalities with essentially presence of a major increase of micronuclei (**Supplementary figure 3**).

CGH array analysis of PB32-ENU-derived hematopoietic cells.

Figure 5 shows the experimental strategy to perform this analysis. We extracted the DNA from either PB32-ENU EB-derived CFC or BI-CFC and compared the genomic abnormalities with those of the PB32 cultured all along without ENU (**figure 5**). Cytogenomics software from Agilent technologies with mosaic workflow allowed to detect 20 quantitative genomics aberrations: copy number variations CNVs which comprised 313 gene loci. After filtration on European Caucasian genomic polymorphism database, 295 gene loci were still comprised in these genomic aberrations (**figure 6A and supplementary table 1**). Majority of the gene loci events were affected by gain of genomic DNA (69%) versus loss (31%) (**Figure 6B and supplementary**

table 1). Matching these genomic aberrations with transcription factor database, cancer gene database and pluripotency gene database allowed to observe that these important deregulated actors were principally affected on chromosomes 5, 7, 21, 22, and X (**figure 6B**). The majority of these genomic events implicated are transcription factors such as: zinc finger ZNF and IRX (**figure 6B**). Some pluripotency genes were also identified as well as cancer genes such as TET1, ALK, EP300, ERG, MKL1, PHF6, already described as being involved in leukemia. Functional enrichment of genomic alterations of EB-derived CFC allowed to highlight perturbations in megakaryocytic development with HBD, HBE1, HBG1 and HBB molecules and HDAC enzymes including EP300 and SIRT1 (**figure 6C and D**). Functional enrichment on Gene Ontology database allowed the identification of SIRT1, EP300 and CDH13 as central molecules, especially SIRT1 which is implicated in p53 dependent-DNA damage in response to hydrogen peroxide and cellular response to hypoxia. SIRT1 is also involved in negative regulation of NK-kappaB (**figure 6E and 6F**).

When the same analysis was performed using DNA of BI-CFC, 22 quantitative genomics aberrations were detected. These included copy number variations (CNVs) which comprised 332 gene loci. After filtration on European Caucasian genomic polymorphism database still 255 gene loci were found to be comprised in these genomic aberrations (**figure 7A and supplementary table 2**). Majority of the gene loci events represented loss of genomic DNA (71%) with loss of heterozygosity (23%) and 6% gains of DNA (**Figure 7B and supplementary table 2**). Matching these genomic aberrations with transcription factor database, cancer gene database and pluripotency gene database allowed the demonstration that these important deregulated actors were principally involved on chromosomes 7, 8, 15, Y, and X (**figure 7B**). Circosplot analysis also allowed to show that the majority of these events involved comprised transcription factors such as MESP; implicated in mesodermal cell migration; and IKZF1 (**figure 7B and 7F**). Amongst the few pluripotency and

cancer genes, we identified IDH2, NCOA2, IKZF1, BLM described as being involved in leukemia (**Figure 7B, 7F**). Functional enrichment of genomic alterations of BI-CFC (referred as CB32) iPSC on KEGG database allowed to highlight perturbations in hematopoietic lineage and cytokine-receptor interaction, affecting: TPO, CSF2RA, ILRA, PIK3RA, CRFL2, cytokines and receptors allowing the activation of JAK-STAT pathway (**figure 7C and 7D**). Functional enrichment on Gene Ontology database allowed important implication of developmental molecules and especially sharing functionalities in mesodermal tissue (**figure 7E and 7F**) such as IKZF1; a transcription factor of the mesodermal development; and MESP1 & 2, two transcription factors implicated in migration of mesodermal cells. Functional enrichment also showed important implication of molecules in relation with the extracellular matrix, cell fate specification and DNA repair.

Comparison of genomic aberrations identified by aCGH in CML iPSC as compared to primary leukemic blast crisis gene profiling.

Transcriptome of CML CD34+ cells in the 3 different phases of the disease: chronic phase (CP), accelerated phase (AP) and blast crisis (BC) were analyzed to extract information of genomic aberrations that we observed in CML PB32-ENU_derived hematopoietic progenitors. On 249 candidate genes, a supervised one-way ANOVA was performed between the 3 phases of the disease (with 1000 permutations and p-value threshold less 1E-3): 125 genes were found significant. Unsupervised principal component analyses performed with them allowed a very significant group discrimination (p-value of discrimination 9.43E-32, **figure 8A and supplementary table 3**). Interestingly, among these genes, some were identified in EB-derived CFC and some in BI-CFC-derived cells (**Figure 8B**). Unsupervised classification performed with the candidate genes, mostly correlated to the progression of the disease, allowed to obtain a perfect reclassification of the

chronic phase samples as compared to the blast crisis samples (**figure 8C**). NCBI gene valorization, performed on these best candidates correlated to the progression disease, allowed to identify eleven genes (**figure 8D**) which were well known in CML pathology, genomic instability and tyrosine kinase inhibitors related keywords in published CML literature (**Figure 8D**). Majority of these candidates, including a group of 7 genes (7 of 11), is predictive for the chronic phase (**figure 8D**), whereas the other group is predictive for blast crisis (4 of 11) (**figure 8D**). Among genes candidates not reported in CML pathophysiology, some were found to be predictive of the blast crisis, such as DDX family like DDX50 and DDX21, very well known in DNA repair and the implication of which is unknown in CML.

DISCUSSION

Mechanisms underlying the progression of CML towards an acute leukemia have been extensively studied during the last four decades (Perrotti et al., 2010) using serially collected patient samples or *in vitro* and *in vivo* models. Major cytogenetic events (Crisan et al., 2015) as well as molecular events contributing to the differentiation arrest have been identified (Melo and Barnes, 2007). In the current era of TKI therapies, the progression has become rare and correlates with resistance to several lines of therapies. Several CML cell lines have been generated from patients in established blast crisis, the first being K562 (Lozzio and Lozzio, 1975). However, these tools do not allow the study of the progressive changes occurring during the clonal evolution of the disease. Similarly, blast crisis in CML can be modeled using murine CML models by using complementation assays using BCR-ABL and an oncogenic fusion protein such as NUP98/ HoxA9 (Dash et al., 2002; Neering et al., 2007). Although these studies can be a major interest to study the *in vivo* behavior of cells, they are not appropriate to study human leukemia in the context of a given genomic background of a patient.

In this work, we wished to evaluate the feasibility of generating a blast crisis model of CML, using patient-specific induced pluripotent stem cells. An iPSC cell line has been established from a patient with TKI-resistant CML and has been previously characterized (Telliam et al., 2016). These cells exhibited all features of pluripotency including cell surface markers and *in vivo* teratoma generating abilities (Telliam et al., 2016) and have been cultured in a pluripotent state for several passages. We have shown that these cells express BCR-ABL and BCR-ABL-signaling, which appears to be preserved during differentiation towards hematopoiesis generated

via embryoid body or blast-cell colony assays (Telliam et al, in preparation). Using clonogenic cell assays, we have shown that this iPSC cell line PB32 exhibits an increased hematopoietic potential as compared to standard ES cells such as H1 or control iPSC without BCR-ABL expression (Telliam et al in preparation). We then wished to determine if we could use this cell line to mimic a progressive transformation *in vitro*. To this purpose, we used ENU, a well-established mutagen and alkylating agent (Acevedo-Arozena et al., 2008). We have previously shown that ENU can be used in CML cell lines to generate ABL-kinase mutations that can be selected *in vitro* by TKI. It allows an *in vitro* production of clinically relevant mutations such as T315I substitution (Aggoune et al., 2014). After testing the appropriate dosing experiments, we used ENU *in vitro* during each daily medium changes. PB32-ENU cells have thus been cultured for > 60 days with PB32 counterparts without ENU. This treatment did not appear to induce any toxicity and no morphological changes in iPSC (data not shown). However, in hematopoiesis induction experiments, we observed a major increase of hematopoietic potential using either EB or Bl-CFC-derived hematopoietic cells (**Figure 1**). Hematopoietic cells generated in these cultures could be expanded in short term cultures, revealing the presence of myeloid precursors and blast-like cell reminiscent of an accelerated phase of CML (**Figure 2**) whereas such pattern was not observed in iPSC cultured without ENU. Interestingly, cytogenetic analyses performed in PB32-ENU cells revealed the presence of several chromosomal abnormalities in addition to Ph1 chromosome (Figure and Table 1). These included the presence, in several mitoses (3 / 64 analyzed) deletion of the chromosome derq9, which has been shown to occur at diagnosis (Kreil et al., 2007) but also during progression towards blast crisis (Huntly et al., 2002; Reid et al., 2002). Another significant abnormality observed was the deletion of chromosome 21 in several mitoses in PB32-ENU cells (**Table 1**). None of these abnormalities are representative of a major or minor route but they have been described in CML patients during blast crises (Storlazzi et al., 2002). The analyses of PB32 ENU

cells as compared to PB32 revealed also the presence of extensive micronuclei formation, suggesting the induction of significant genomic instabilities in these cells (**Supplementary Figure 3**). Micronuclei are characteristics of cells undergoing DNA damage, especially in malignant cells (Terradas et al., 2010). They are formed during mitosis and can be due to the presence of double strand DNA breaks (Terradas et al., 2010). Increased micronucleus frequency has been shown to be a feature of myelodysplastic syndromes and to be higher in patients with refractory anemia with excess of blasts (Kuramoto et al., 2002). To analyze the chromosomal abnormalities at the genomic level, we performed CGH array analyses to compare PB32-ENU-derived hematopoietic cells or BI-CFC as compared to PB32 without ENU treatment (**Figure 5**). This analysis revealed several major genomic aberrations (**Figure 6 and 7**). In hematopoietic cells, we observed several losses (31%) or gains (69%) involving all chromosomes and some of major genes involved in oncogenesis such as TET1, ALK, ERG and MALAT1 (**Figure 6**). Several transcription factor genes were also involved such as ZNF or ERG family of transcription factors (**Figure 6**). Functional enrichment on Gene Ontology database showed the implication of SIRT1, EP300 and CDH13; SIRT1 being involved in TP53-dependent DNA damage.

The analysis performed using comparative hybridization of BI-CFC DNA, yielded additional information with losses (71%) and gains (6%). Matching these genomic aberrations with transcription factor database, cancer gene database and pluripotency gene database allowed to confirm that these affecting essentially chromosomes 7, 8, 15, Y, and X (**figure 7B**). Circosplot analysis showed that the majority of these abnormalities implicated transcription factors such as MESP (implicated in mesodermal cell migration) and IKZF1 (**7B and 7F**). Amongst pluripotency genes, we have identified cancer genes (IDH2, NCOA2, IKZF1, BLM) which are already described as being involved in leukemia. Functional enrichment of genomic alterations of CB32 IPSC on KEGG database allowed to highlight perturbations in hematopoietic lineage and

cytokine-receptor interaction, affecting: TPO, CSF2RA, ILRA, PIK3RA, CRFL2, cytokines and receptors allowing activation of JAK-STAT pathway (**figure 7C and 7D**).

We then asked whether the abnormalities identified using CGH arrays could be matched with genomic aberrations described in primary leukemic cells from blast crisis patients. Amongst 249 genes identified by aCGH in CML iPSC, 125 have been found to be already described in CML progression (**Figure 8 and Supplementary Table 3**). These positively correlating genes include IL3RA, ACP1, FHL1, SH3YL1 (**Supplementary figure 5**). It has been shown that IL3RA (IL3 receptor alpha) is highly expressed on AML cells (Ehninger et al., 2014) and can be targeted using an anti CD123 monoclonal antibody in CML blast cells (Nievergall et al., 2014). Genes correlating negatively with CML progression included CSF2RA (GM-CSF alpha receptor) which has been shown to be implicated in AML biology (Matsuura et al., 2012). ANPEP is the gene coding for CD13 antigen, which has been shown to be associated with monocytic / myeloid differentiation (Xu, 2006). It is of interest to note that we have identified in this screen, this gene to be negatively correlated with CML progression (**Supplementary figure 4**). The relevance of some of the genes identified in the progression of CML in our screen will require further study. In summary, we report in this work the possibility of reproducing *in vitro*; using patient-specific iPSC and genomic background; the feasibility of creating a model mimicking genomic, some cytogenetic and cytological features of blast crisis. It remains to be determined if the patient that we analyzed for this purpose, was prone to the development of such a tool due to the initial resistance of the leukemic cells to Imatinib. It also remains to be determined if the stem cell model that we generated this way could lead to the generation of an *in vivo* model in immunodeficient mice. These experiments are currently underway in our laboratory. This first demonstration of the feasibility of using this approach to model blast crisis could open new perspectives for the future use of CML iPSC for disease modeling and eventually drug screening strategies.

Figures legends

Figure 1 : Impact of ENU exposure in hematopoietic potential of CML IPS derived BL-CFC. (A) Hematopoietic cell count from EB or BI-CFC PB32 CML-IPSC or IPSC control. **(B)** On the top - Experimental procedure used, Hematopoietic cell count from PB32 CML-IPSC exposed or not to 10µg/ml ENU during 2 months. Statistical Mann-Whitney t.test was performed with PRISM software (n > 6, from 2 independent experiments).

Figure 2 : Cytological evaluation of hematopoietic cells generated in IPSC treated with ENU. (A) Hematopoietic CFC after 2 months of ENU exposure. **(B)** May-Grunewald Giemsa staining analysis of cells isolated from methycellulose cultures revealing myeloid differentiation features: polynuclear neutrophil **PN**, macrophage **M**, metamelocyte **MM** and some characteristics suggesting the presence of undifferentiated blast cells **BL**.

Figure 3 : Flow cytometry evaluation of hematopoietic cells generated after long term ENU exposure of CML iPSC. Double staining experiments showed the presence of CD45⁺/CD43⁺ and CD45⁺/CD38⁺/CD133⁺ cells demonstrating generation of hematopoietic cells with primitive characteristics (n = 3).

Figure 4 : Evaluation of the H2AX phosphorylation in patient-derived iPSC. (A) Experimental approach. **(B)** Western blot analysis of the phosphorylation level of the histone variant H2AX (γH2AX) on Ser-139 after 0, 2, 10 and 30 min of ENU at 50µg/ml in CML-IPS cell line and IPS control (30µg of protein per conditions). **(C)** Quantification of the γH2AX compared to beta-ACTIN with ImageJ software, histogrammes represent means of 3 independent experiments. Two way ANOVA test with multiple comparaison was made with PRISM software.

Figure 5 : Experimental protocol used for aCGH experimental procedure. EB-derived Hematopoietic cell DNA from day 40 ENU-exposed CML iPSC and BI-CFC DNA from day 60 ENU-exposed CML iPSC was compared to non-treated CML-iPSC.

Figure 6 : aCGH analysis of EB-derived CFC. (A) Quantitative genomics aberrations: copy number variations CNVs, **(B)** Matching of genomic aberrations with transcription factor database, cancer gene database and pluripotency gene database, circosplot show in green: 5 zinc finger ZNF genes and 2 IRX, in blue: pluripotency genes, in red: cancer genes. **(C-D)** Functional enrichment of genomic alterations of CFC on KEGG database. **(E-F)** Functional enrichment on Gene Ontology database.

Figure 7 : aCGH analysis of Bl-CFC. (A) Cytogenomics software from Agilent technologies with mosaic workflow: quantitative genomics aberrations (copy number variations CNVs which comprised 332 gene locus). After filtration on European Caucasian genomic polymorphism database 255 gene locus are comprised in these genomic aberrations. **(B)** Percentage of genomic loss, gains and LOH (Loss of heterozygosity), match of genomic aberrations with transcription factor database, cancer gene database and pluripotency gene database. **(C-D)** Functional enrichment of genomic alterations of Bl-CFC on KEGG database. **(E-F)** Functional enrichment on Gene Ontology database.

Figure 8 : Comparative analysis of genomic aberrations discovered in CML-iPSC aCGH with the gene profiling described in primary CML CD34+ cells. (A) In silico analysis of genomic aberrations found in our study as compared to gene profiling of CML CD34+ cells described in Radich (Radich et al., 2006) in the 3 different phases of the disease: chronic phase (CP), accelerated phase (AP) and blast crisis (BC) were analyzed to extract information of genomic aberrations that we observed under ENU exposure, supervised with one-way ANOVA. **(B)** Genes related to CFC or Bl-CFC aCGH analysis. **(C)** Classification of the chronic phase samples as compared to the blast crisis samples. **(D)** NCBI gene valorization performed one the best candidates correlated to the progression disease and well known in CML pathology, genomic instability and tyrosine kinase inhibitors related keywords; in green: predictive candidates to chronic phase, in red: predictive candidates to blast crisis.

Table 1 : Additional chromosomes abnormalities.

Supplementary figure 1 : Phenotypic characterization of CML-IPSC derived hematopoietic cells.

Supplementary figure 2 : Chromosome abnormalities detected after long term ENU exposure (A) CML IPSC karyotype with the presence of Ph chromosome. **(B)** Mitosis of CML IPSC after 2 months of ENU exposure showing a der 9q+ loss.

Supplementary figure 3 : Evaluation of genomic instability in CML iPSC using micronucleus detection technology. CML iPSC were compared to control ESC and IPSC with and without long term ENU exposure at 10µg/ml. The Yellow arrows show micronuclei and the white arrow shows nuclear buds (NBUD's).

Supplementary figure 4 : Genes detected in aCGH array of CML iPSC derived hematopoietic cells and whose expression was found to be reduced in CML blast phase in Radish' transcriptome analysis using CD34+ cells.

Supplementary figure 5 : Genes detected in aCGH array of CML iPSC derived hematopoietic cells and whose expression was found to be increased in CML blast phase in Radish' transcriptome analysis using CD34+ cells.

REFERENCES

- Acevedo-Arozena, A., Wells, S., Potter, P., Kelly, M., Cox, R.D., and Brown, S.D.M. (2008). ENU Mutagenesis, a Way Forward to Understand Gene Function. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 49–69.
- Aggoune, D., Tosca, L., Sorel, N., Bonnet, M.-L., Dkhissi, F., Tachdjian, G., Bennaceur-Griscelli, A., Chomel, J.-C., and Turhan, A.G. (2014). Modeling the influence of stromal microenvironment in the selection of ENU-induced BCR-ABL1 mutants by tyrosine kinase inhibitors. *Oncoscience* 1.
- Bolton-Gillespie, E., Schemionek, M., Klein, H.-U., Flis, S., Hoser, G., Lange, T., Nieborowska-Skorska, M., Maier, J., Kerstiens, L., Koptyra, M., et al. (2013). Genomic instability may originate from imatinib-refractory chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood* 121, 4175–4183.
- Brancotte, B., Biton, A., Bernard-Pierrot, I., Radvanyi, F., Rey, F., and Cohen-Boulakia, S. (2011). Gene List significance at-a-glance with GeneValorization. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 1187–1189.
- Canitrot, Y. (2003). p210 BCR/ABL kinase regulates nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV radiation. *Blood* 102, 2632–2637.
- Canitrot, Y., Lautier, D., Laurent, G., Frechet, M., Ahmed, A., Turhan, A.G., Salles, B., Cazaux, C., and Hoffmann, J.S. (1999). Mutator phenotype of BCR– ABL transfected Ba/F 3 cell lines and its association with enhanced expression of DNA polymerase β . *Oncogene* 18, 2676–2680.
- Cline, M.S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys, N., Workman, C., Christmas, R., Avila-Campilo, I., Creech, M., Gross, B., et al. (2007). Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat. Protoc.* 2, 2366–2382.
- Crisan, A.M., Coriu, D., Arion, C., Colita, A., and Jordan, C. (2015). The impact of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis and during therapy with tyrosine kinase inhibitors in Chronic Myeloid Leukaemia. *J. Med. Life* 8, 502.
- Culhane, A.C., Thioulouse, J., Perrière, G., and Higgins, D.G. (2005). MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 21, 2789–2790.
- Dash, A.B., Williams, I.R., Kutok, J.L., Tomasson, M.H., Anastasiadou, E., Lindahl, K., Li, S., Van Etten, R.A., Borrow, J., Housman, D., et al. (2002). A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7622–7627.
- Deutsch, E., Dugray, A., AbdulKarim, B., Marangoni, E., Maggiorella, L., Vaganay, S., M’Kacher, R., Rasy, S.D., Eschwege, F., Vainchenker, W., et al. (2001). BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* 97, 2084–2090.
- Deutsch, E., Jarrousse, S., Buet, D., Dugray, A., Bonnet, M.-L., Vozenin-Brotons, M.-C., Guilhot, F., Turhan, A.G., Feunteun, J., and Bourhis, J. (2003). Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood* 101, 4583–4588.

- Ehninger, A., Kramer, M., Röllig, C., Thiede, C., Bornhäuser, M., von Bonin, M., Wermke, M., Feldmann, A., Bachmann, M., Ehninger, G., et al. (2014). Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 4, e218.
- Futreal, P.A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., and Stratton, M.R. (2004). A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer* 4, 177–183.
- Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M., and Brors, B. (2014). circlize Implements and enhances circular visualization in R. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 30, 2811–2812.
- Hu, Y., Yan, C., Hsu, C.-H., Chen, Q.-R., Niu, K., Komatsoulis, G.A., and Meerzaman, D. (2014). OmicCircos: A Simple-to-Use R Package for the Circular Visualization of Multidimensional Omics Data. *Cancer Inform.* 13, 13–20.
- Huntly, B.J., Bench, A.J., Delabesse, E., Reid, A.G., Li, J., Scott, M.A., Campbell, L., Byrne, J., Pinto, E., Brizard, A., et al. (2002). Derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia: poor prognosis is not associated with loss of ABL-BCR expression, elevated BCR-ABL levels, or karyotypic instability. *Blood* 99, 4547–4553.
- Kantarjian, H. (1987). Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med.* 83(3), 445–454.
- Koptyra, M., Cramer, K., Slupianek, A., Richardson, C., and Skorski, T. (2008). BCR/ABL promotes accumulation of chromosomal aberrations induced by oxidative and genotoxic stress. *Leukemia* 22, 1969–1972.
- Kreil, S., Pffirmann, M., Haferlach, C., Waghorn, K., Chase, A., Hehlmann, R., Reiter, A., Hochhaus, A., Cross, N.C.P., and for the German Chronic Myelogenous Leukemia (CML) Study Group (2007). Heterogeneous prognostic impact of derivative chromosome 9 deletions in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 110, 1283–1290.
- Kuramoto, K., Ban, S., Oda, K., Tanaka, H., Kimura, A., and Suzuki, G. (2002). Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome cells. *Leukemia* 16, 2253–2258.
- Lerou, P., and Daley, G. (2005). Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev.* 19, 321–331.
- Liu, J., and Wang, Z. (2015). Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 1–12.
- Lozzio, C.B., and Lozzio, B.B. (1975). Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line With Positive Philadelphia Chromosome. *Blood. Vol. 45, No.3*, 321–334.
- Matsuura, S., Yan, M., Lo, M.-C., Ahn, E.-Y., Weng, S., Dangoor, D., Matin, M., Higashi, T., Feng, G.-S., and Zhang, D.-E. (2012). Negative effects of GM-CSF signaling in a murine model of t(8;21)-induced leukemia. *Blood* 119, 3155–3163.
- Melo, J.V., and Barnes, D.J. (2007). Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 441–453.
- Mitelman, F. (1993). The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* 11, 11–15.

- Müller, F.-J., Laurent, L.C., Kostka, D., Ulitsky, I., Williams, R., Lu, C., Park, I.-H., Rao, M.S., Shamir, R., Schwartz, P.H., et al. (2008). Regulatory networks define phenotypic classes of human stem cell lines. *Nature* 455, 401–405.
- Neering, S.J., Bushnell, T., Sozer, S., Ashton, J., Rossi, R.M., Wang, P.-Y., Bell, D.R., Heinrich, D., Bottaro, A., and Jordan, C.T. (2007). Leukemia stem cells in a genetically defined murine model of blast-crisis CML. *Blood* 110, 2578–2585.
- Nievergall, E., Ramshaw, H.S., Yong, A.S., Biondo, M., Busfield, S.J., Vairo, G., Lopez, A.F., Hughes, T.P., White, D.L., and Hiwase, D.K. (2014). Monoclonal antibody targeting of IL-3 receptor α with CSL362 effectively depletes CML progenitor and stem cells. *Blood* 123, 1218–1228.
- O'Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J.J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., et al. (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348, 994–1004.
- Perrotti, D., Jamieson, C., Goldman, J., and Skorski, T. (2010). Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J. Clin. Invest.* 120, 2254–2264.
- Radich, J.P., Dai, H., Mao, M., Oehler, V., Schelter, J., Druker, B., Sawyers, C., Shah, N., Stock, W., Willman, C.L., et al. (2006). Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2794–2799.
- Reid, A.G., Huntly, B.J., Hennig, E., Niederwieser, D., Campbell, L.J., Bown, N., Telford, N., Walker, H., Grace, C.D., Deininger, M.W., et al. (2002). Deletions of the derivative chromosome 9 do not account for the poor prognosis associated with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99, 2274–2275.
- Shah, N.P., Nicoll, J.M., Nagar, B., Gorre, M.E., Paquette, R.L., Kuriyan, J., and Sawyers, C.L. (2002). Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2, 117–125.
- Sloma, I., Jiang, X., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. (2010). Insights into the stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 24, 1823–1833.
- Slupianek, A., Gurdek, E., Koptyra, M., Nowicki, M.O., Siddiqui, K.M., Groden, J., and Skorski, T. (2005). BLM helicase is activated in BCR/ABL leukemia cells to modulate responses to cisplatin. *Oncogene* 24, 3914–3922.
- Soverini, S., Colarossi, S., Gnani, A., Rosti, G., Castagnetti, F., Poerio, A., Iacobucci, I., Amabile, M., Abruzzese, E., Orlandi, E., et al. (2006). Contribution of ABL Kinase Domain Mutations to Imatinib Resistance in Different Subsets of Philadelphia-Positive Patients: By the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 12, 7374–7379.
- Stoklosa, T., Poplawski, T., Koptyra, M., Nieborowska-Skorska, M., Basak, G., Slupianek, A., Rayevskaya, M., Seferynska, I., Herrera, L., Blasiak, J., et al. (2008). BCR/ABL inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations. *Cancer Res.* 68, 2576–2580.

Storlazzi, C.T., Anelli, L., Surace, C., Rocchi, M., Albano, F., Pastore, D., Liso, V., and Specchia, G. (2002). Molecular cytogenetic characterization of a novel additional chromosomal aberration in blast crisis of a Ph-positive chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* *134*, 109–113.

Telliam, G., Féraud, O., Griscelli, F., Opolon, P., Divers, D., Bennaceur-Griscelli, A., and Turhan, A.G. (2016). Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with chronic myeloid leukemia (CML) resistant to targeted therapies. *Stem Cell Res.* *17*, 235–237.

Terradas, M., Martín, M., Tusell, L., and Genescà, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat. Res. Mutat. Res.* *705*, 60–67.

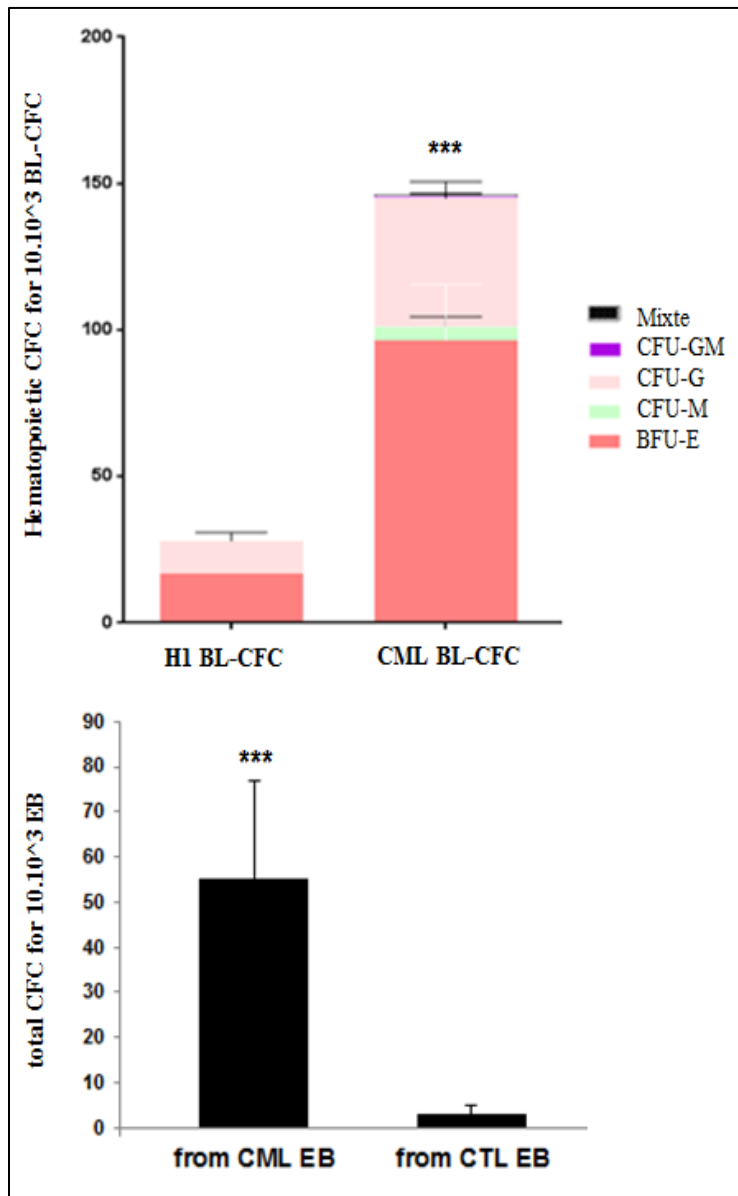
Vaquerizas, J.M., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A., and Luscombe, N.M. (2009). A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 252–263.

Xu, Y. (2006). Immunophenotypic identification of acute myeloid leukemia with monocytic differentiation. *Leukemia* *20*, 1321–1324.

Zambon, A.C., Gaj, S., Ho, I., Hanspers, K., Vranizan, K., Evelo, C.T., Conklin, B.R., Pico, A.R., and Salomonis, N. (2012). GO-Elite: a flexible solution for pathway and ontology over-representation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *28*, 2209–2210.

Figure 1

A



B

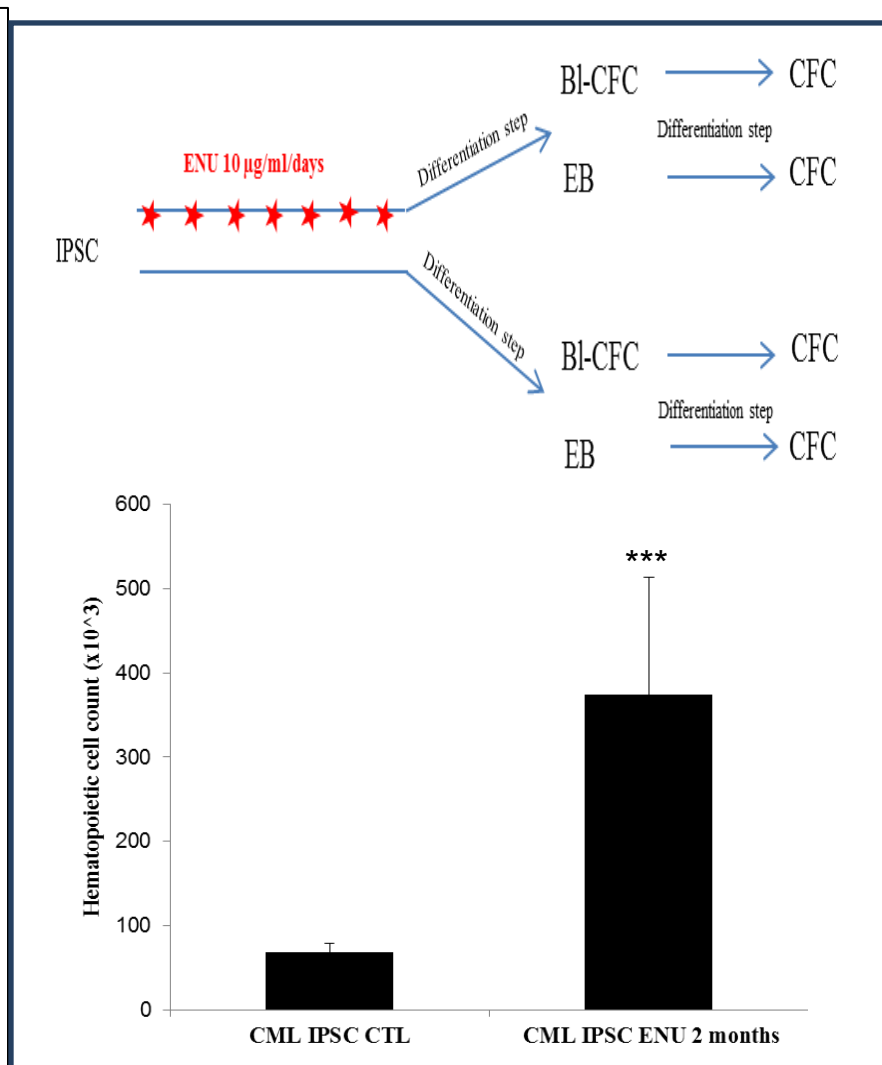
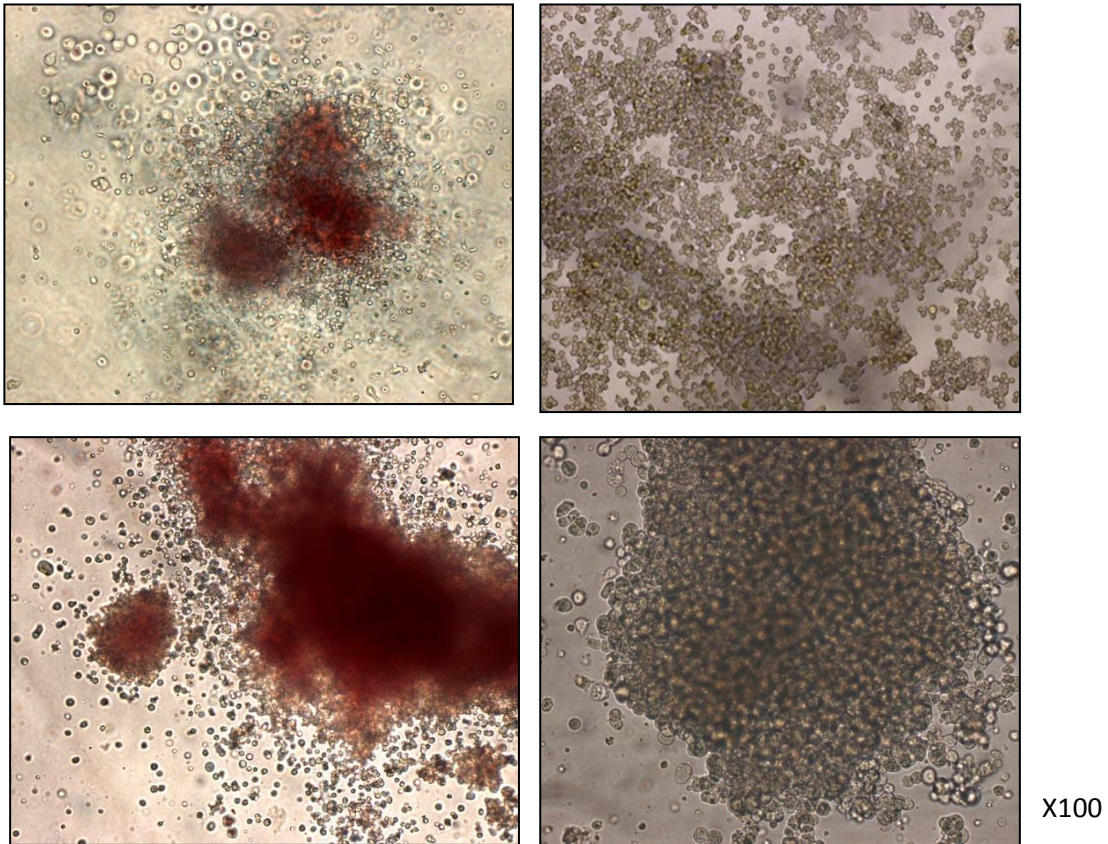


Figure 2

A



B

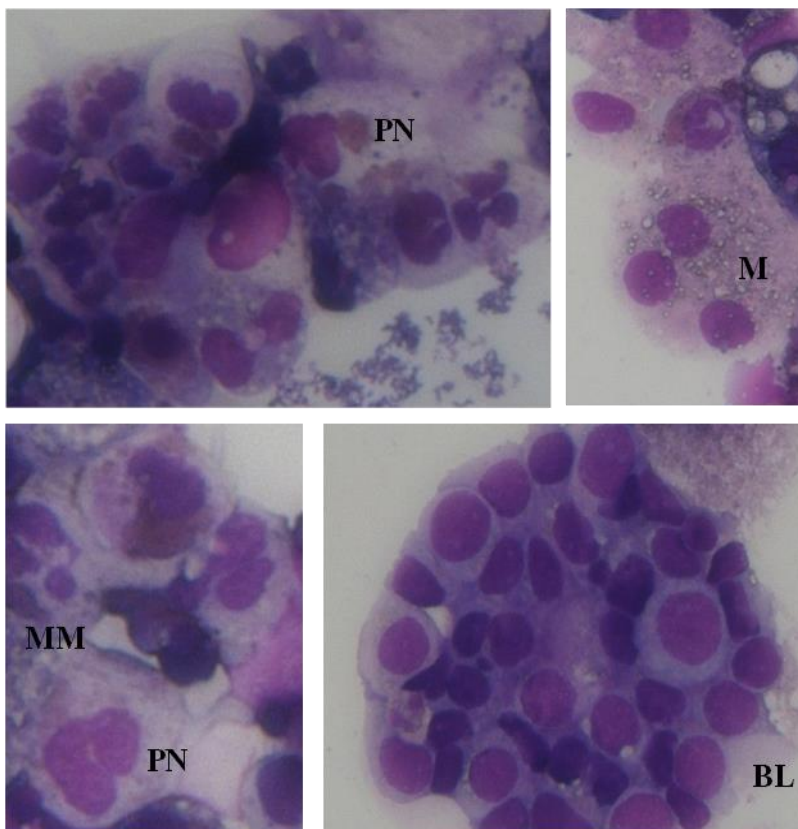


Figure 3

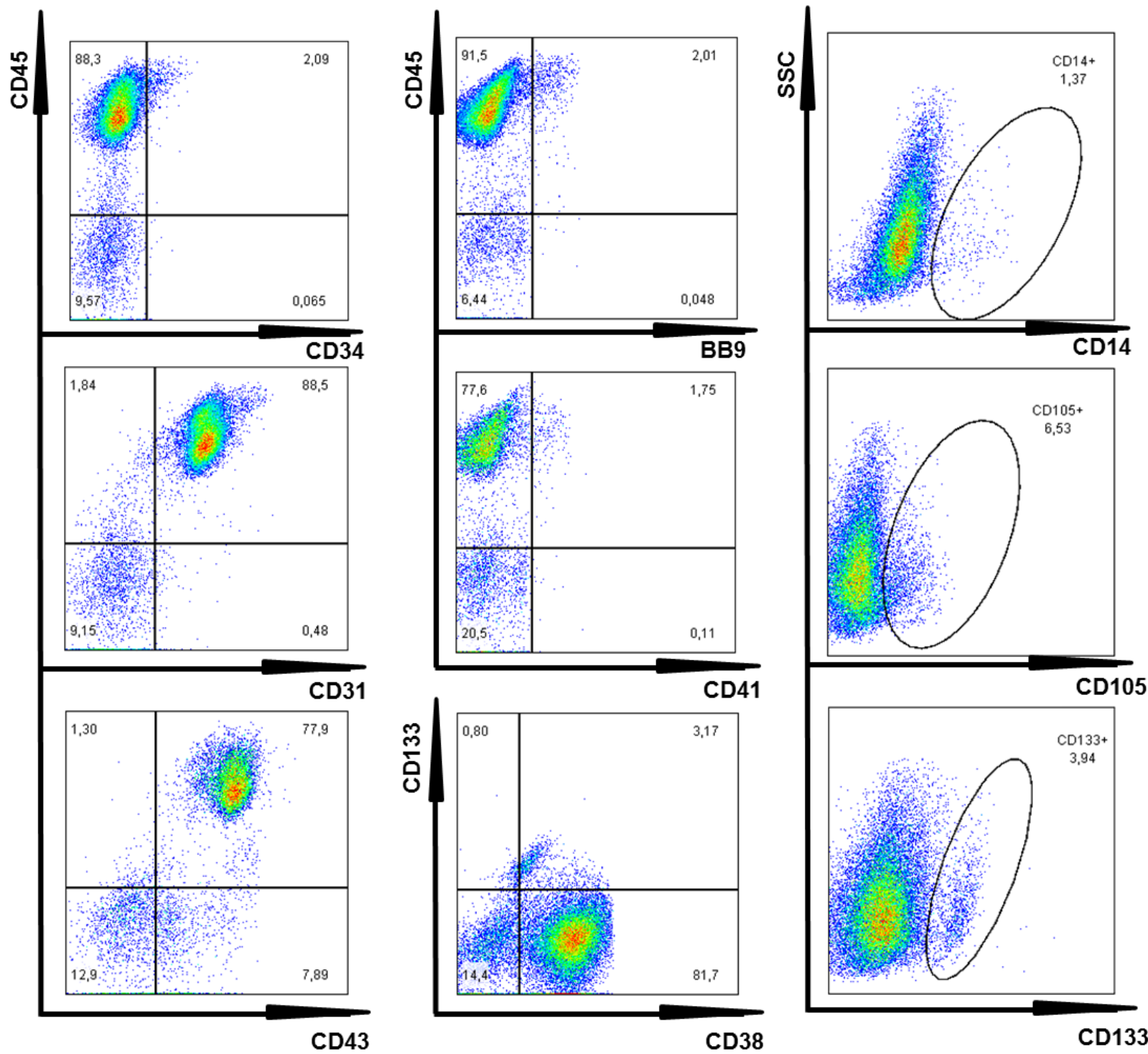
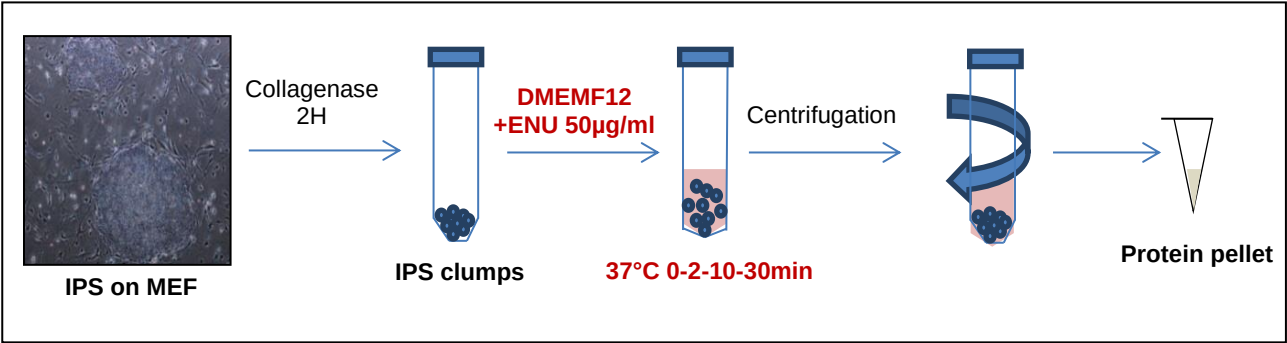
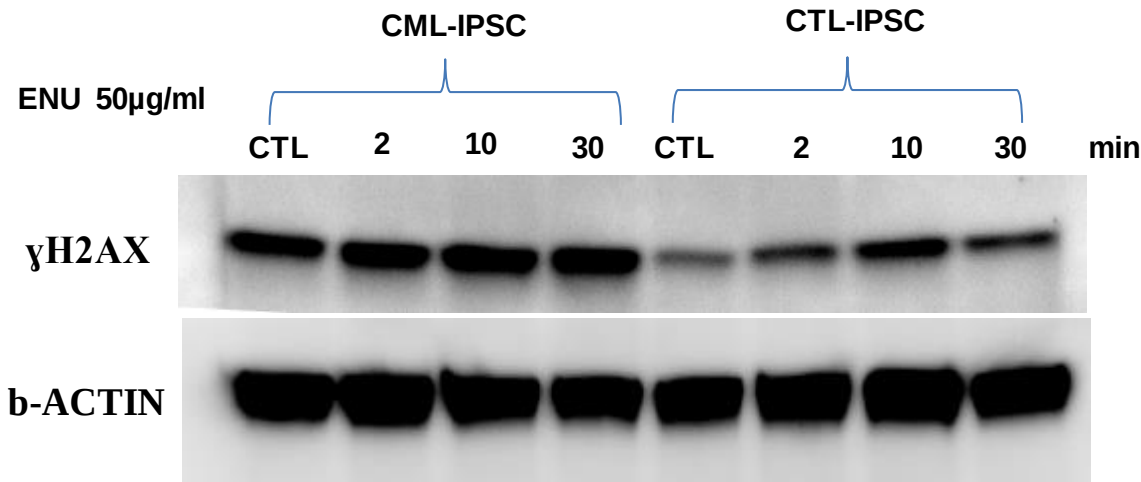


Figure 4

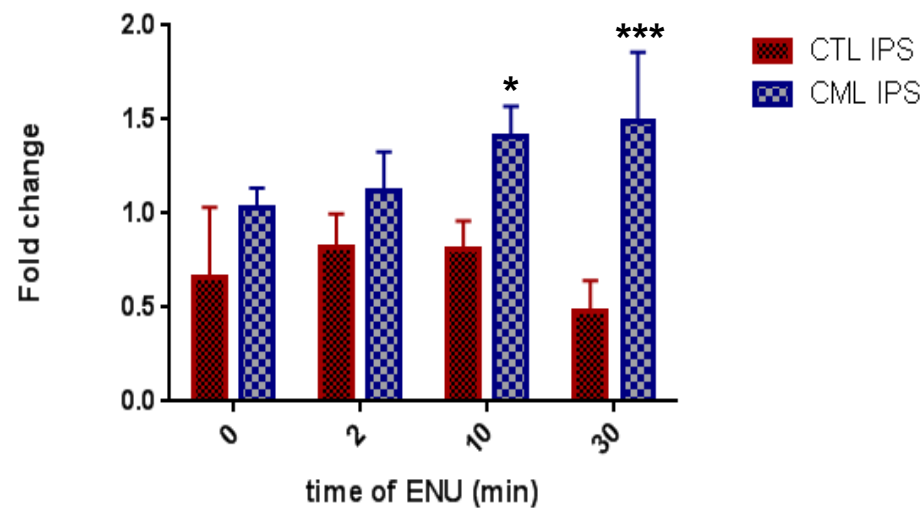
A



B



C



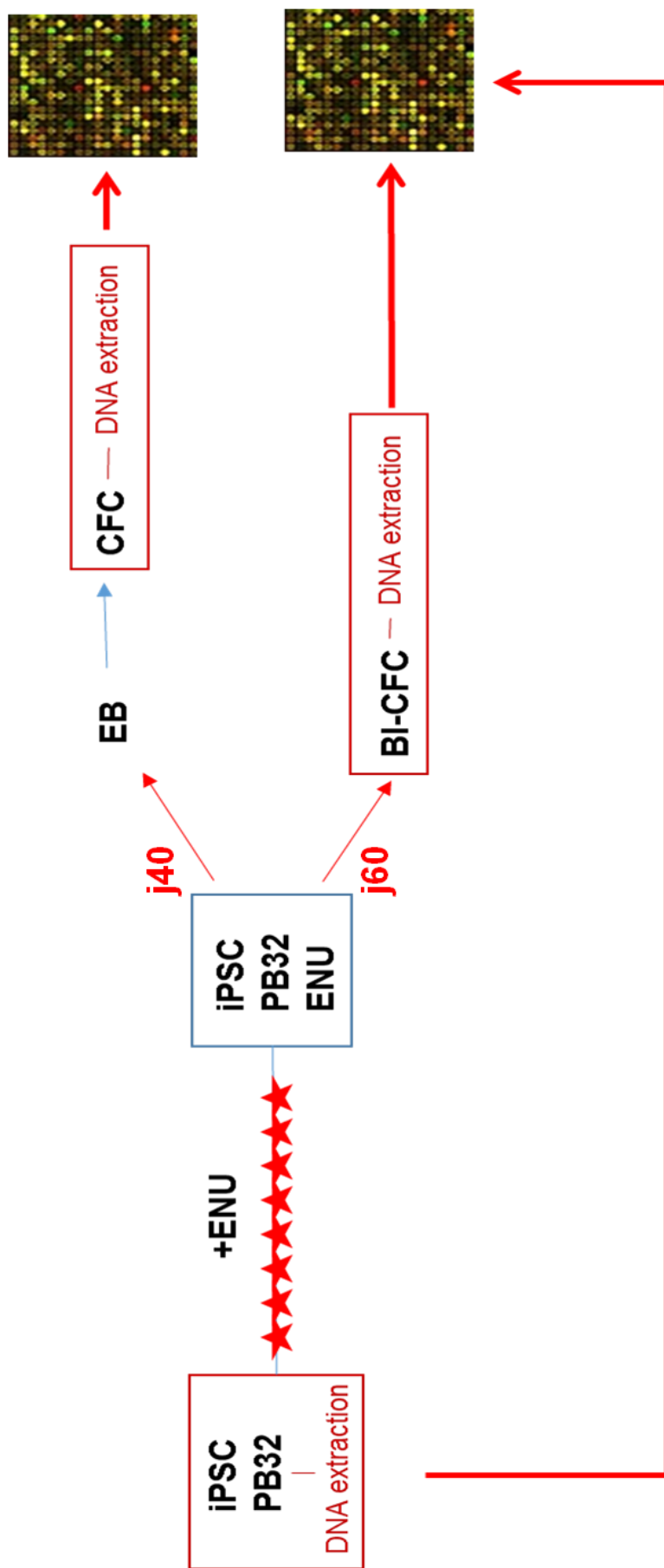


Figure 6

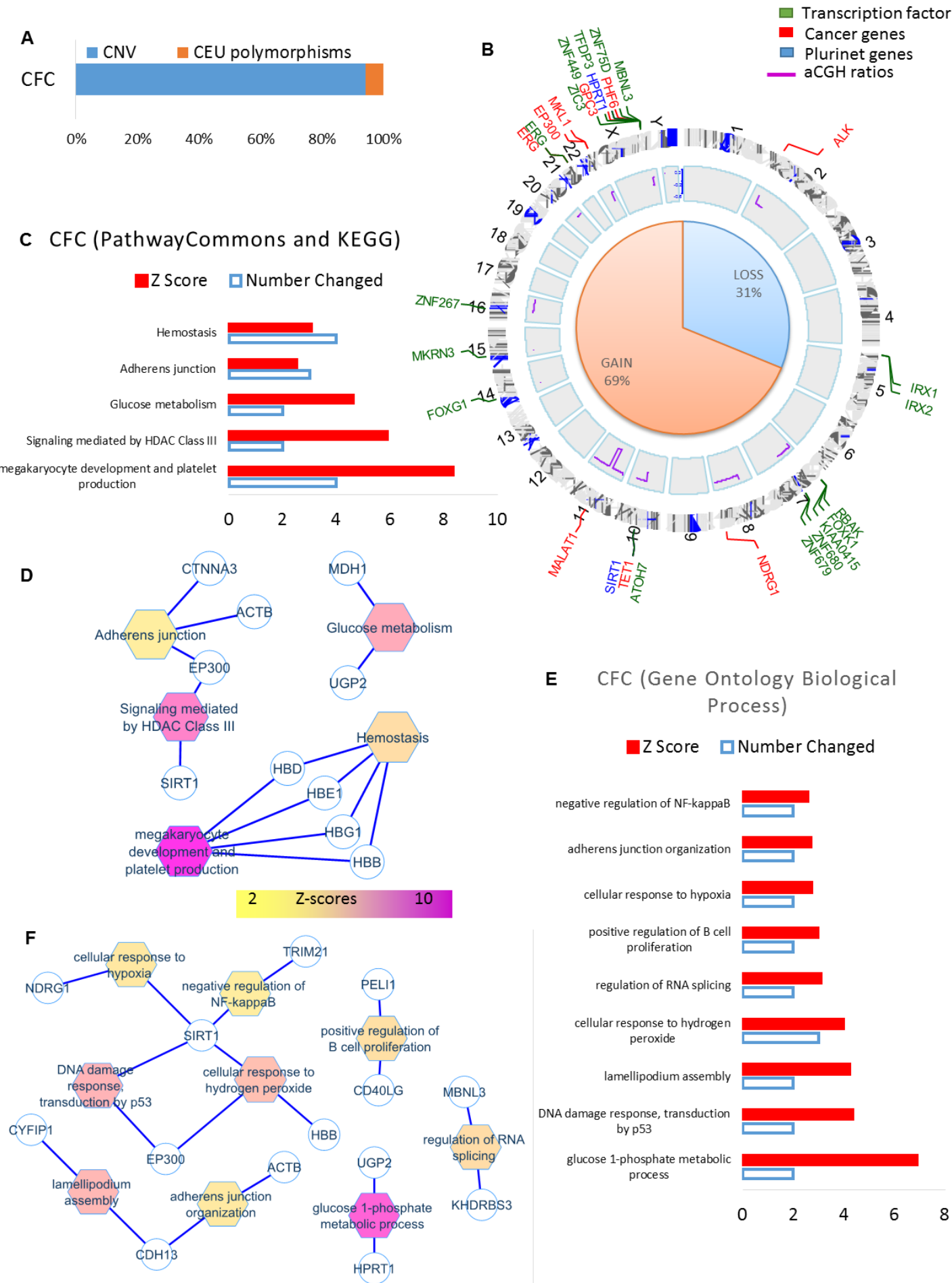


Figure 7

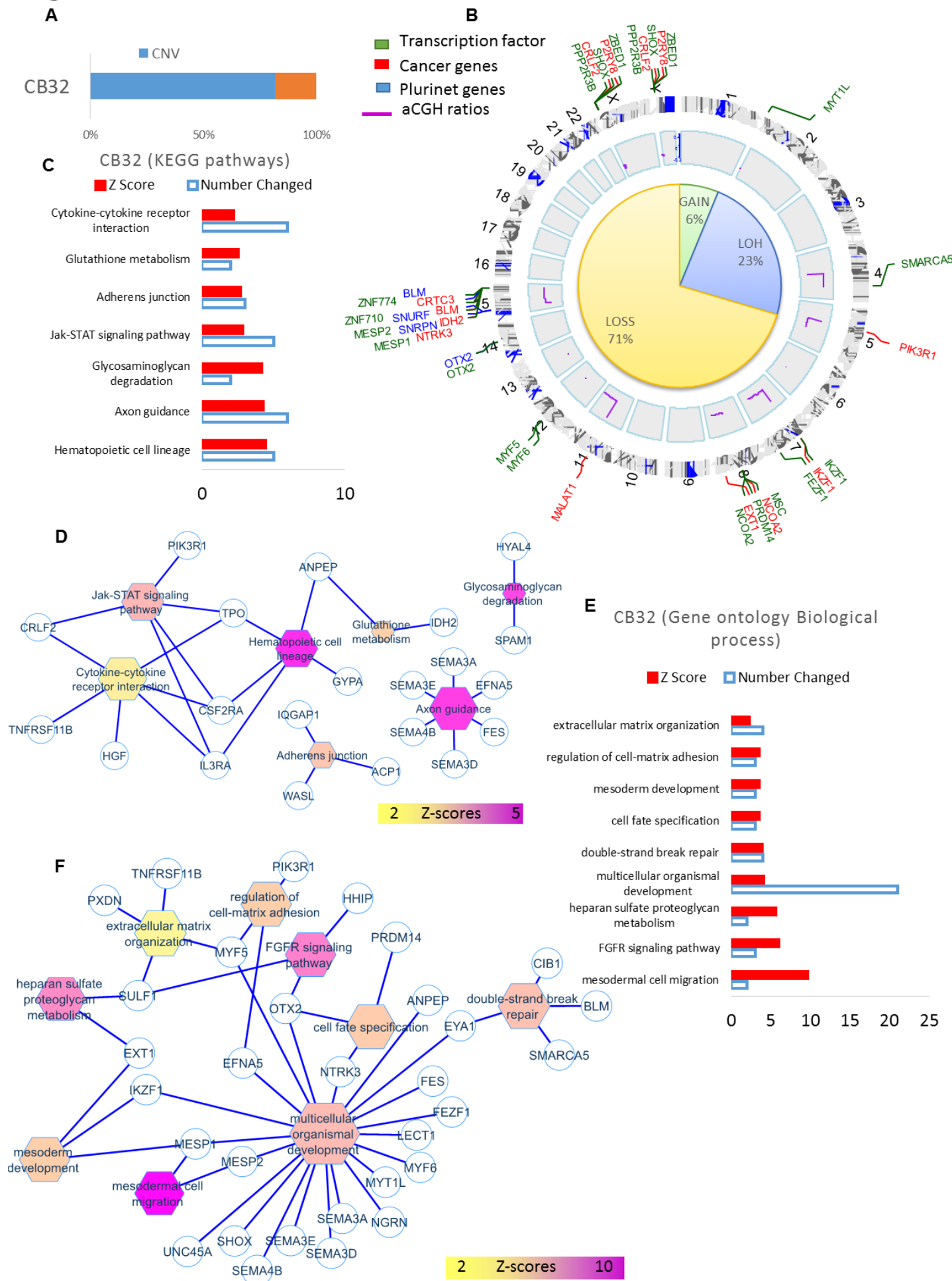


Figure 8

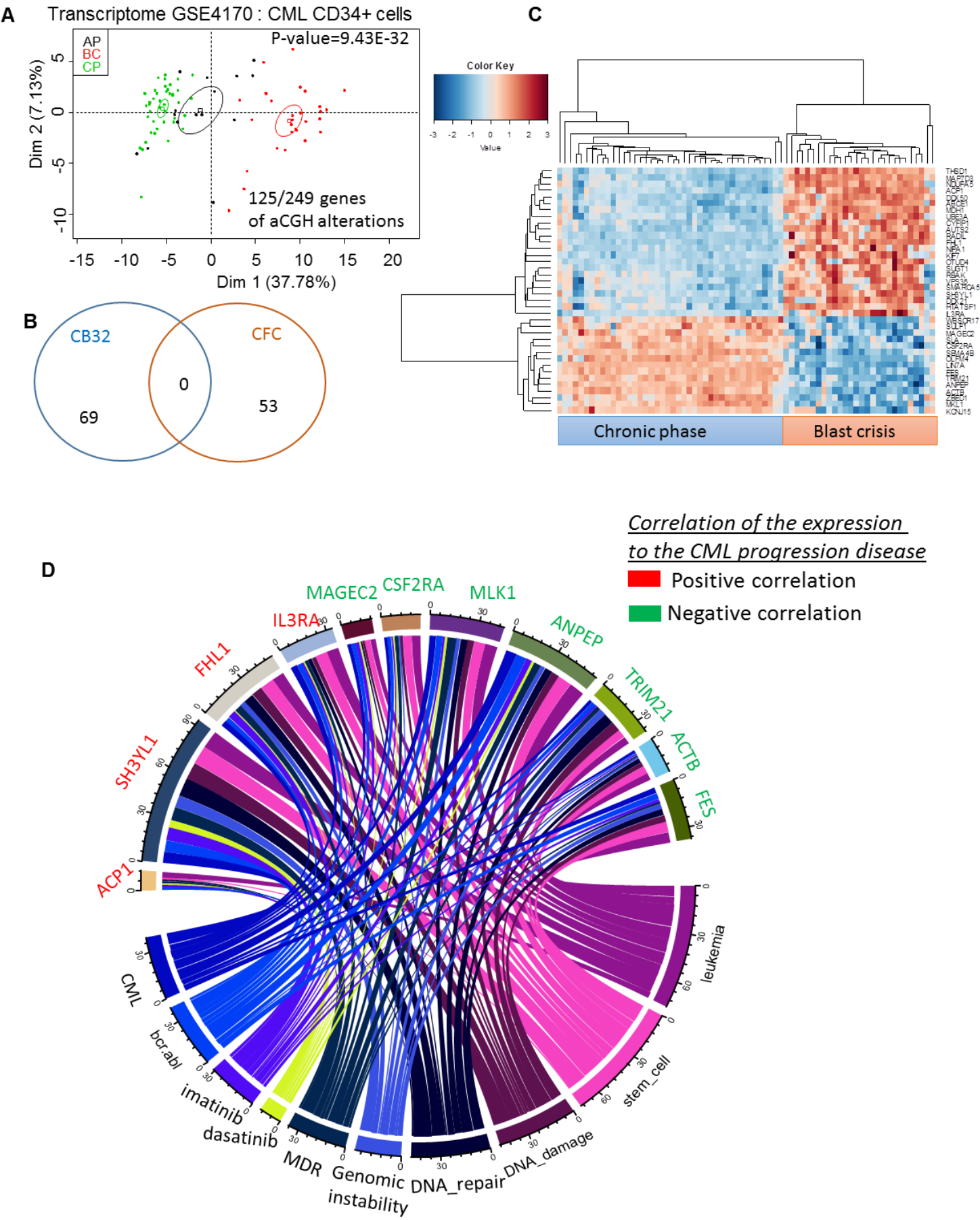
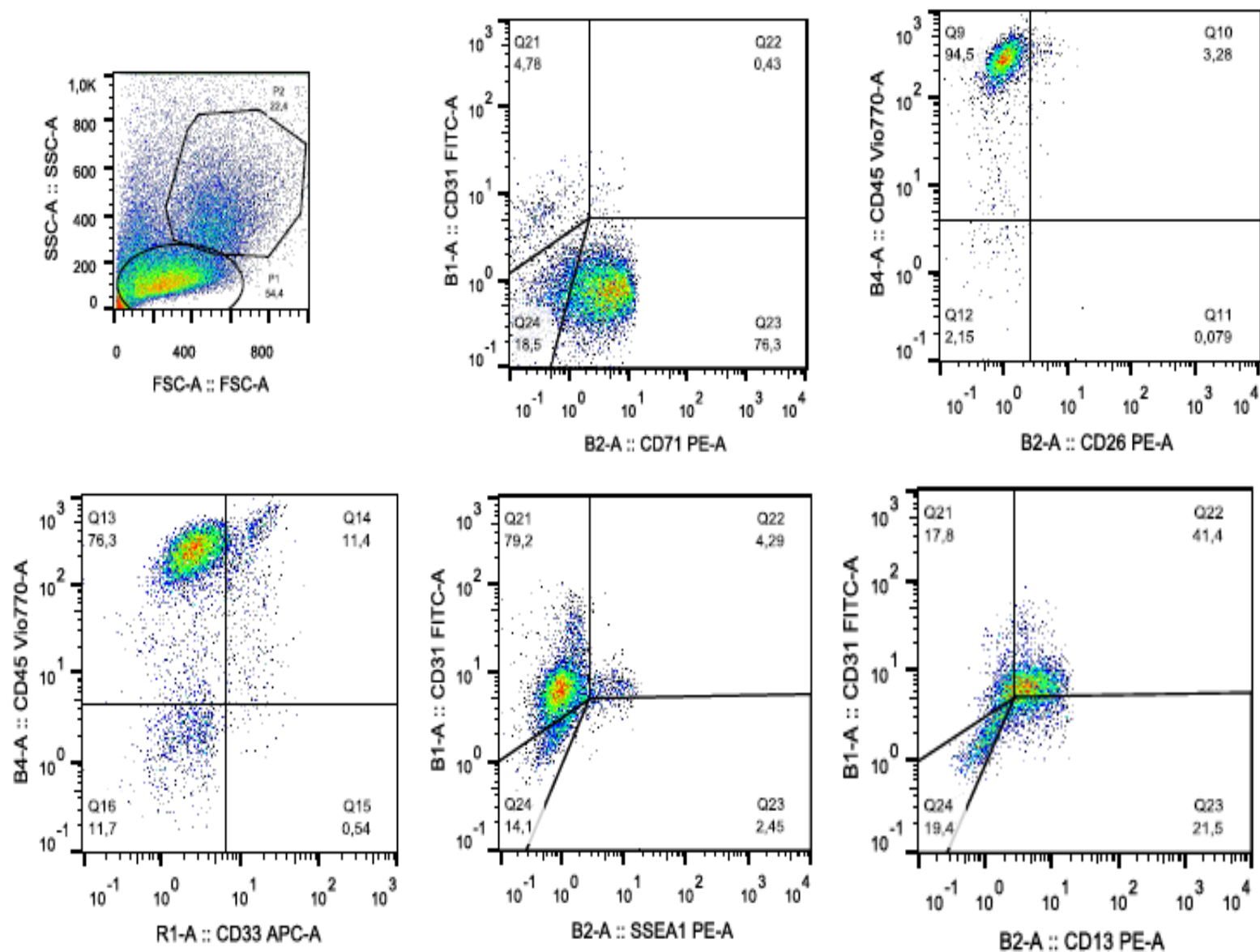


Table 1

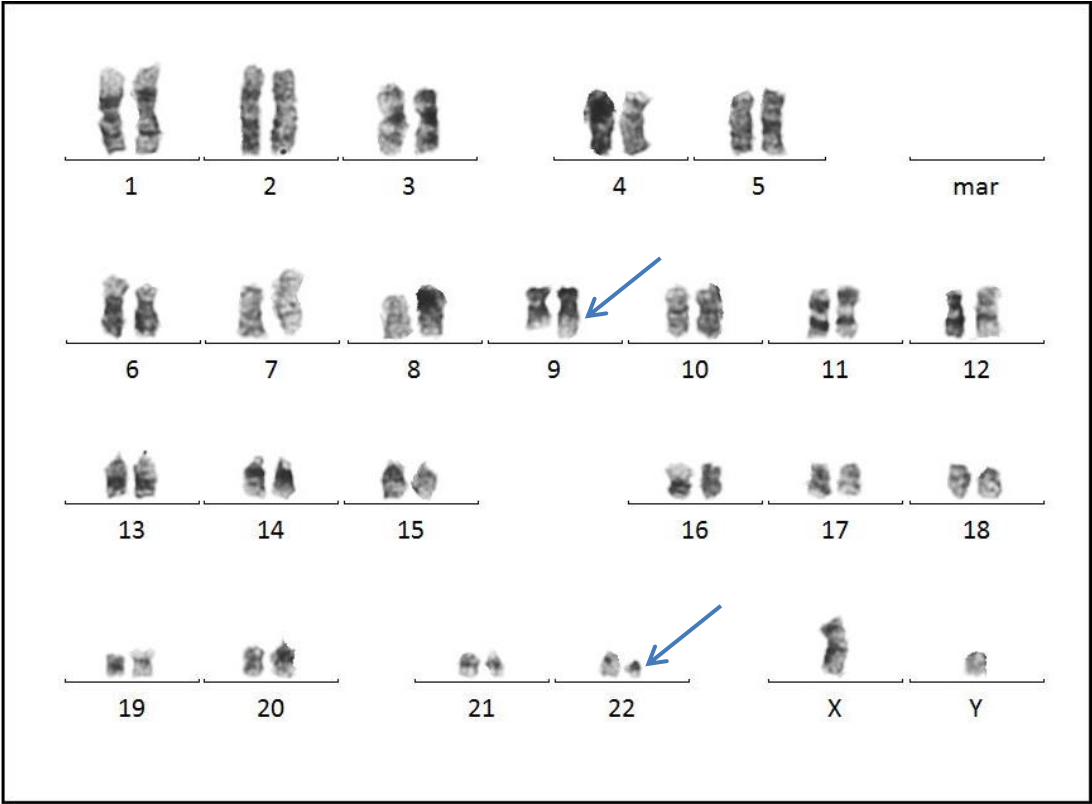
iPSC	Additional Chromosome Abnormalities	Mitosis ratio	%
PB32+ENU Ph1+	21	5 loss / 64	8
	9 q ⁺	3 loss / 64	5
	17	1 loss / 64	>2
	19	1 loss / 64	>2
	20	1 loss / 64	>2
	13	1 loss / 64	>2
	1	1 loss / 64	>2
	2	1 loss / 64	>2
PB32 Ph1+	/	/	/
PB33 Ph1-	/	/	/
PB33+ENU Ph1-	/	/	/

Supplementary figure 1

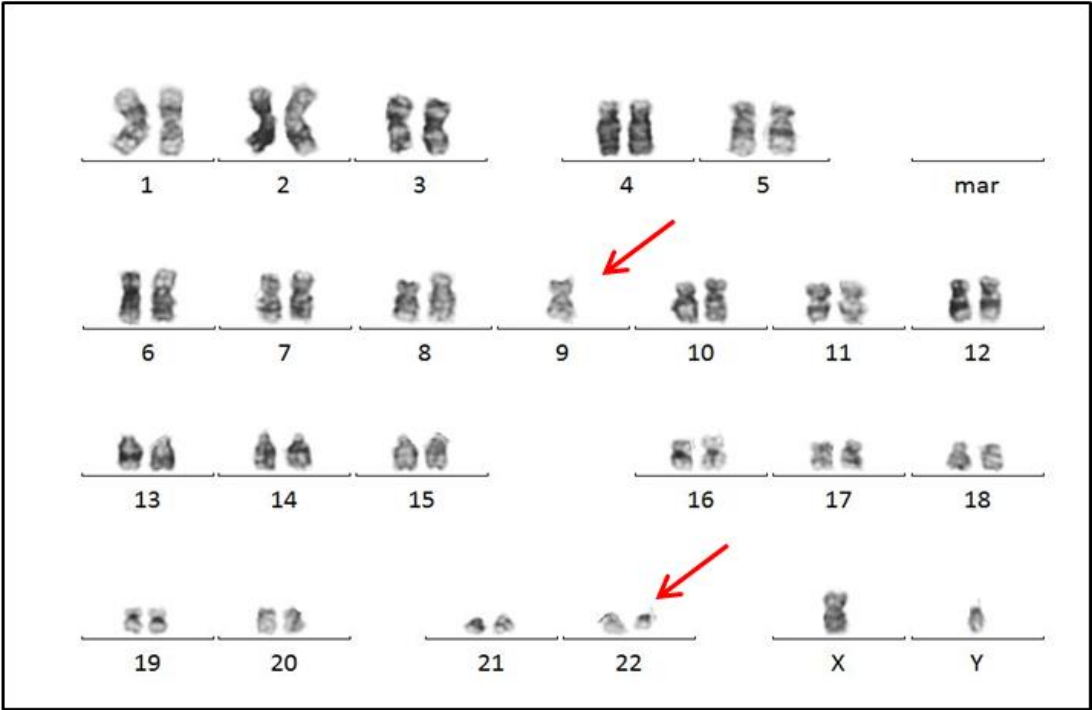


Supplementary figure 2

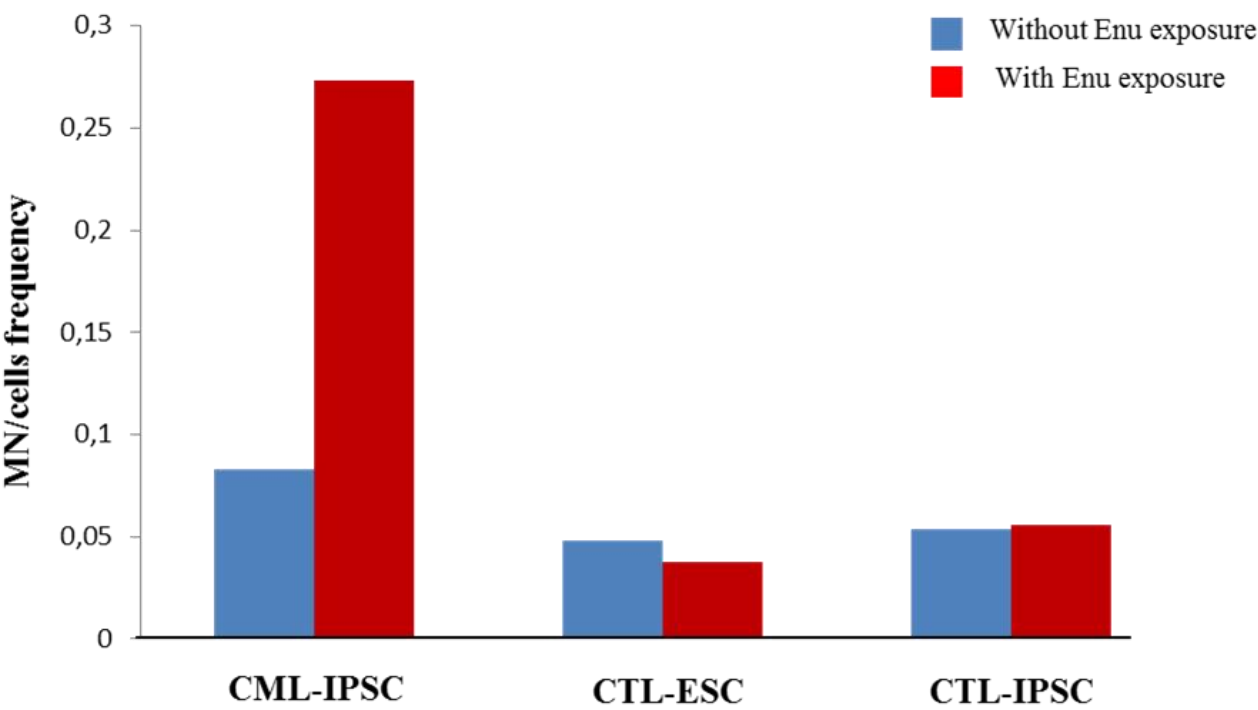
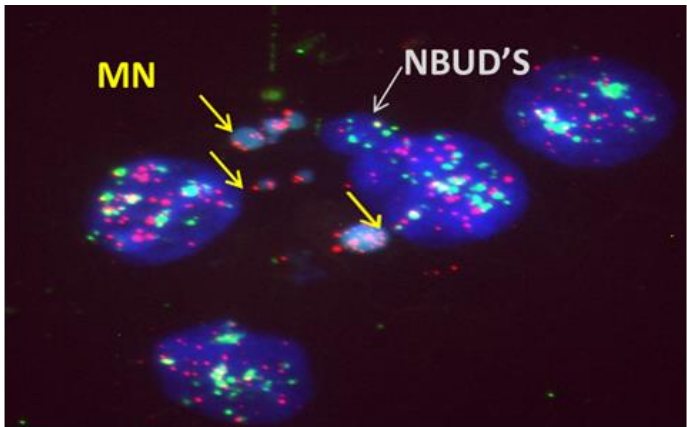
A



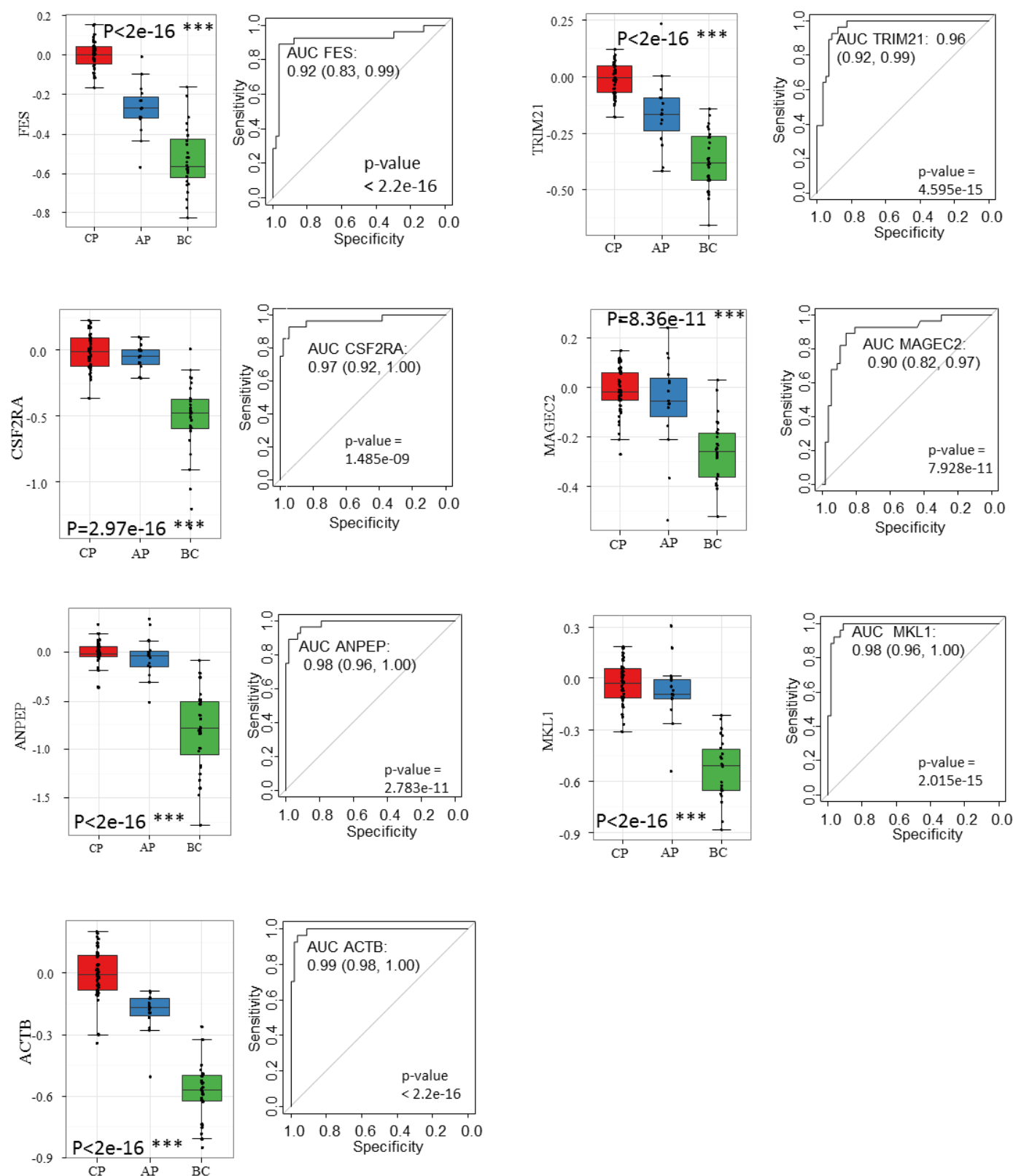
B



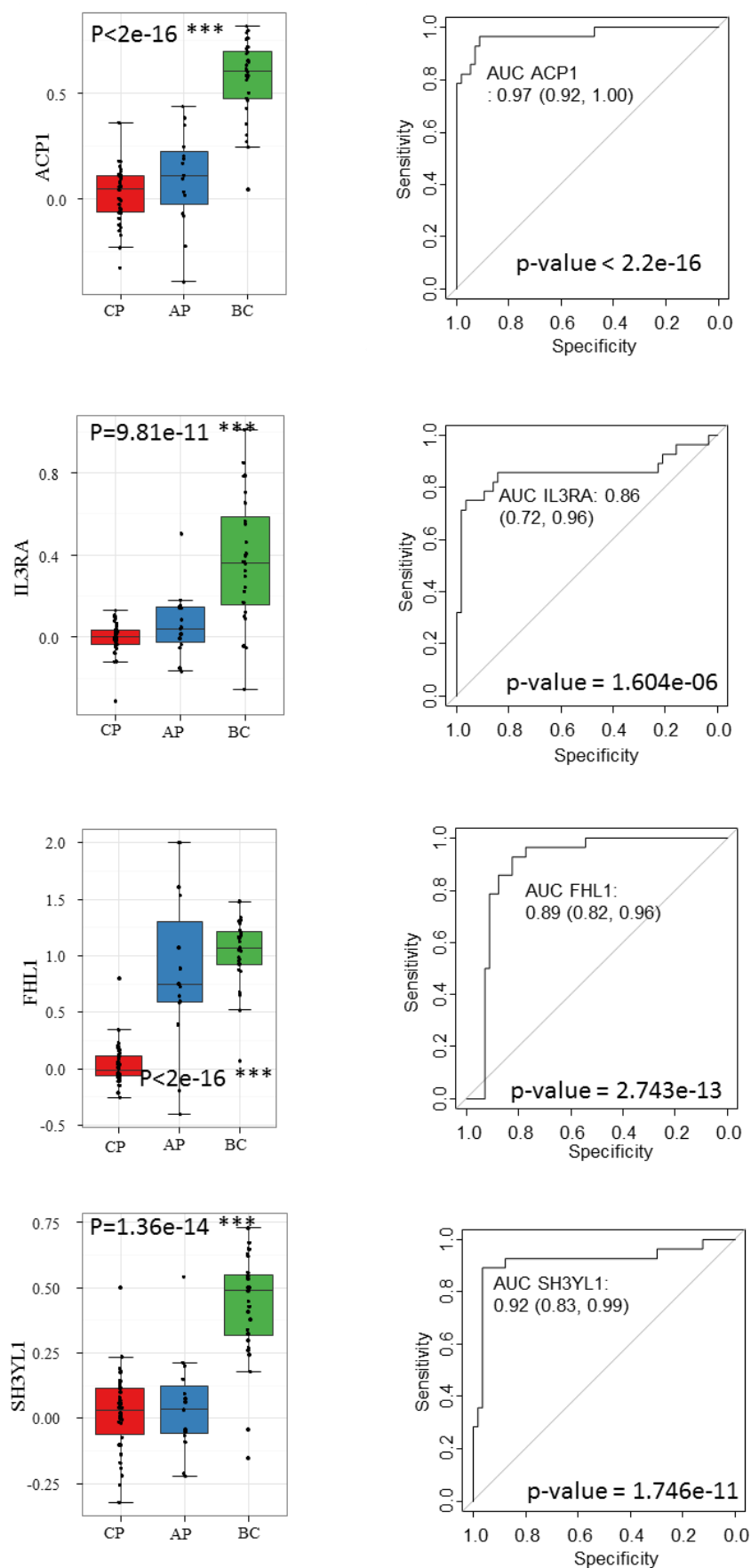
Supplementary figure 3



Supplementary figure 4



Supplementary figure 5



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

Depuis la description de la première lignée leucémique K562 porteuse du chromosome Ph1 en 1975, de nombreux modèles de LMC ont été développés allant des modèles murins jusqu'aux modèles de cellules souches embryonnaires murines, pour comprendre la physiopathologie de la maladie et pour développer et tester de nouvelles thérapeutiques. Certains de ces modèles notamment le modèle murin de greffe après transfert du gène bcr-abl ont été utilisés avec un succès majeur, pour identifier des voies de signalisation impliquées dans la leucémogenèse et plus récemment pour tester l'efficacité des ITK, conduisant à l'introduction à la clinique de ces médicaments qui ont changé le pronostic de la maladie. L'utilisation des modèles de cellules ES murines a été extrêmement utile pour identifier des voies de signalisation comme par exemple STAT3, activé de manière spécifique par BCR-ABL dans le contexte des cellules ES murines et contribuant ainsi à leur autorenouvellement (Coppo et al., 2003). Ces résultats ont pu conduire à la démonstration de l'activation de STAT3 dans les cellules de crise blastique de patients (Coppo et al., 2006) et plus récemment au développement de molécules anti-STAT3 associés aux ITK chez les patients atteints de LMC (Redell et al., 2011).

La surexpression de BCR-ABL dans les cellules ES murines a montré aussi la capacité de BCR-ABL de conférer aux cellules ES un potentiel hématopoïétique accru avec possibilité de générer une hématopoïèse à long-terme (Melkus et al., 2013).

La découverte de la possibilité de reprogrammation des cellules somatiques et, en particulier celles des cellules de LMC, a ouvert plus récemment des perspectives majeures pour reproduire les cellules les plus primitives exprimant BCR-ABL, dans les conditions proches des cellules primaires, avec le chromosome Ph1 spécifique d'un patient donné et ainsi, étudier les stades les plus précoces de la maladie modélisée *in vitro*. D'autre part, les données obtenues chez la souris montrant la possibilité de générer à partir des ES murines exprimant BCR-ABL, des CSH avec un potentiel de prolifération et d'autorenouvellement. La possibilité de générer un modèle d'iPSC de LMC devenait très attractive. En effet, l'établissement d'une hématopoïèse définitive à partir des cellules ES ou iPSC de LMC pourraient permettre d'identifier des gènes impliqués dans l'acquisition de ce potentiel.

Plusieurs équipes ont montré la possibilité de générer des iPSC de LMC comme cela a été discuté dans l'introduction de ce travail, mais à ce jour, aucunes n'a pu montrer la génération d'un potentiel de CSH.

Au sein de l'Unité U935, spécialisée dans la génération et la manipulation des cellules ES et iPSC, mon projet de doctorat avait pour but d'établir ce modèle à partir des cellules iPSC obtenues par reprogrammation des cellules leucémiques primaires d'un patient atteint de LMC et résistant aux inhibiteurs de tyrosine kinase (Telliam 2016).

La lignée PB32 présente toutes les caractéristiques requises d'une cellule souche pluripotente avec la présence du chromosome Philadelphie, l'expression de l'ARNm et de la protéine BCR-ABL. Nous avons donc pu utiliser cette lignée exprimant BCR-ABL pour montrer qu'elle présente un potentiel clonogénique accru lors de la génération de colonies blastiques (hémangioblaste *in vitro*) par rapport à une lignée souche embryonnaire (H1), connue comme référence en termes de potentiel de différenciation hématopoïétique. Les expériences de Western blot ont montré l'intégrité de l'activité TK de BCR-ABL dans ce contexte, à la fois dans les BL-CFC et les EB et dans toutes les expériences, nous avons pu montrer, via EB ou via BL-CFC, l'augmentation de potentiel hématopoïétique de PB32 par rapport aux témoins. Le potentiel clonogénique de la lignée PB32, lors de la génération de cellules hématopoïétiques (CFU assay), était également diminué sous l'action de l'imatinib ou du dasatinib, suggérant l'établissement d'un phénotype myéloprolifératif proche de la maladie humaine. Il est certes intéressant de noter que le patient à l'origine de l'établissement de l'iPSC a présenté une résistance clinique à l'Imatinib, mais il s'agit d'une notion de résistance clinique et il est difficile d'établir une corrélation entre la résistance clinique et biologique, notamment au niveau des cellules hématopoïétiques dérivées de l'iPSC qui ont subi des modifications épigénétiques. La disponibilité de phénotype myéloprolifératif reproductible, permettra dans les expériences actuellement en cours, de tester la possibilité de générer à partir de ces cellules, une hématopoïèse *in vivo* chez la souris NSG. Ces expériences pourront être réalisées en présence d'un antagoniste de l'AHR comme SR1, car nous avons également montré que l'expression d'AHR est réduite dans la lignée iPSC de LMC et qu'il est possible d'accentuer cette inhibition par utilisation d'AHR. Enfin, des études de transcriptome seront également réalisées comparant les progéniteurs hématopoïétiques dérivés de la lignée iPSC et les cellules leucémiques primaires du patient cryopréservées au diagnostic, afin de mieux caractériser les cellules dérivées de l'iPSC.

Nous avons par la suite exploré la possibilité de générer, à partir de la lignée iPSC de ce patient ; établi à partir des cellules de phase chronique ; un modèle de progression de la maladie éventuellement vers une « crise blastique » *in vitro*. En effet, tous les modèles de crise blastique *in vitro* sont des lignées établies à partir des cellules de phase blastique de patients (il n'existe pas de lignée de LMC de phase chronique) et ces cellules cultivées depuis de nombreuses années dans divers laboratoires ne sont pas représentatives de cette phase et surtout ne permettent pas d'étudier les événements qui doivent progressivement survenir dans le clone Ph1, présent lors de l'initiation de la maladie. Suite aux travaux réalisés à partir d'échantillons de patients en phase blastique, plusieurs anomalies (marqueurs chromosomiques et moléculaires) ont pu être identifiées (Perrotti et al., 2010). L'hypothèse principale de la progression vers une phase accélérée puis blastique est d'une part l'existence d'un phénotype mutateur des cellules leucémiques (Canitrot et al., 1999) et d'autre part (éventuellement en rapport avec ce dernier), une accumulation d'anomalies génomiques liées entre autre au stress oxydatif directement induit par BCR-ABL (Koptyra et al., 2008) entraînant des cassures double brin dans une cellule présentant par ailleurs un système de réparation déficient (Deutsch et al., 2001, 2003; Skorski, 2002).

Pour tester la faisabilité d'un modèle de progression à partir des iPSC, nous avons choisi une approche de mutagenèse par utilisation d'ENU, un mutagène entraînant des endommagements d'ADN et, qui avait été utilisé dans le modèle de la lignée UT7 exprimant BCR-ABL (Aggoune et al., 2014). Les travaux précédents du laboratoire, avait en effet montré la possibilité de générer des mutations ABL-kinase *in vitro* dans ces cellules sélectionnées en présence des ITK, avec la possibilité de générer la mutation « gatekeeper » T315I. J'ai pu utiliser cette approche dans notre lignée iPSC avec le but de créer de manière chronique et prolongée des anomalies génomiques en présence de l'expression de BCR-ABL.

Nous avons montré que sous l'action de l'ENU, la lignée PB32 présentait une persistance accrue de cassures double brin, objectivée par la persistance de l'histone variant H2AX phosphorylé. Après plusieurs semaines de cultures avec ENU, ajouté dans les milieux de manière quotidienne, nous avons analysées ces cellules à l'état pluripotent et après différenciation, sur le plan cytologique, cytogénétique et moléculaire. Cette approche a permis de générer une lignée PB32 désigné sous le terme de PB32-ENU. L'analyse cytogénétique a montré, la présence d'anomalies cytogénétiques additionnelles absentes dans la lignée PB32 ou PB33 témoins, dont certaines ont déjà été décrites dans les cellules primaires de patients en phase blastique comme la délétion du chromosome 9q+ et la perte du chromosome 21. Ces anomalies étaient accompagnées de la détection de micronoyaux dont la

fréquence était augmentée de manière significative uniquement dans la lignée PB32-ENU, témoignant de l'apparition d'une instabilité génomique dans cette lignée (Article 3 Figure Suppl).

De manière intéressante, lors des expériences de différenciation hématopoïétique des progéniteurs, générés à partir de l'IPSC PB32-ENU, nous avons observé une accentuation du potentiel clonogénique des cellules par rapport à PB32, dont le potentiel hématopoïétique était accru par rapport aux témoins. Sur le plan cytologique, on a observé dans les cultures liquides établis à court terme, la présence de précurseurs immatures et de blastes indifférenciés. Enfin, l'analyse en CGH array des cellules Bl-CFC et CFC a montré des anomalies moléculaires dont certaines représentent de nouveaux biomarqueurs et éventuellement de nouvelles cibles. En effet, des aberrations ont inclus plusieurs gènes impliqués dans la réparation d'ADN, notamment SIRT1 et BLM déjà décrits dans les cellules primaires de patients. D'autres anomalies impliquées dans la leucémogenèse en général ont été identifiées, notamment IKZF1, NCOA2, ALK, EP300, ERG, MKL1, PHF6 and TET1.

Nous avons ensuite interrogé la base de données geodataset GSE 4170 (Radich et al., 2006) compilant les résultats d'un transcriptome de cellules primaires de patients en phase blastique de manière comparative avec les anomalies détectées dans notre modèle. Cette analyse a révélé que 125 / 249 aberrations que nous avons identifiées, étaient déjà décrites comme étant associées à la progression de la maladie vers la crise blastique. Parmi cette liste, 38 gènes permettent une distinction claire entre la phase chronique et la phase blastique et certains comme IL3RA ont déjà été décrits comme étant impliqués dans la phase blastique de LMC (Ågerstam et al., 2015; Jordan et al., 2000).

En résumé, l'ensemble des résultats que nous avons obtenus suggère à l'heure actuelle, la faisabilité et l'utilité de l'approche de la reprogrammation des cellules leucémiques pour modéliser la physiopathologie de la LMC. Plusieurs pistes de recherche restent à explorer, avec en premier lieu la possibilité de générer une hématopoïèse leucémique *in vivo*, notamment par utilisation des cellules dérivées de PB32-ENU. Pour cela, nous effectuerons de nouvelles expériences de tératomes afin de suivre la formation éventuelle de tératocarcinome. La formation de ces tératomes anormaux pourrait également permettre l'apparition et la colonisation, de la moelle osseuse des souris, par les cellules souches leucémiques aux potentiels de reconstitutions à long terme. En effet, il a été montré que les tératomes pouvaient constituer une « niche », contenir les signaux et types cellulaires nécessaires à l'émergence des cellules souches hématopoïétiques adultes (Amabile et al., 2013; Suzuki et al., 2013). Ces cellules pouvaient également reconstituer l'hématopoïèse de souris immunodéficientes, lors de greffes sériées.

Enfin, la génération d'une hématopoïèse définitive à partir des cellules ES ou iPSC est un vrai 'Graal' en Hématologie. En cas de reconstitution hématopoïétique à long-terme, il sera important de réaliser un profil d'expression des cellules greffées de manière à identifier une signature génomique compatible avec l'acquisition de ce potentiel, afin d'utiliser ces connaissances pour induire le potentiel hématopoïétique « souche » dans les cellules souches pluripotentes normales. Nous espérons que les expériences que j'ai réalisées au cours de ma Thèse pourront également être utiles pour répondre à ces questions.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26, 1276–1284.
- Abelson, H.T., and Rabstein, L.S. (1970). Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res.* 30, 2213–2222.
- Ågerstam, H., Karlsson, C., Hansen, N., Sandén, C., Askmyr, M., von Palffy, S., Högborg, C., Rissler, M., Wunderlich, M., Juliusson, G., et al. (2015). Antibodies targeting human IL1RAP (IL1R3) show therapeutic effects in xenograft models of acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 10786–10791.
- Ahmed, W., and Van Etten, R.A. (2013). Signal Transduction in the Chronic Leukemias: Implications for Targeted Therapies. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 8, 71–80.
- Amps, K., Andrews, P.W., Anyfantis, G., Armstrong, L., Avery, S., Baharvand, H., Baker, J., Baker, D., Munoz, M.B., Beil, S., et al. (2011). Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat. Biotechnol.* 29, 1132–1144.
- Anafi, M. (1992). Selective interactions of transforming and normal abl proteins with ATP, tyrosine-copolymer substrates, and tyrophostins. *J. Biol. Chem.* 267(7), 4518–4523.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., et al. (2011). Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* 8, 376–388.
- Baikie, A. (1960). A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia. *Nature.* 188, 1165–1166.
- Becker, K.A., Ghule, P.N., Therrien, J.A., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., and Stein, G.S. (2006). Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J. Cell. Physiol.* 209, 883–893.
- Bedel, A., Pasquet, J.-M., Lippert, E., Taillepiere, M., Lagarde, V., Dabernat, S., Dubus, P., Charaf, L., Beliveau, F., de Verneuil, H., et al. (2013). Variable behavior of iPSCs derived from CML patients for response to TKI and hematopoietic differentiation. *PloS One* 8, e71596.
- Bennett, J.H. (1980). Classics in Oncology: Two cases of disease and enlargement of the spleen in which death took place from the purulent matter in the blood. *CA. Cancer J. Clin.* 30, 59–62.
- Boros, L.G., and Williams, R.D. (1998). Chronic isofenphos poisoning: case report of agnogenic myeloid metaplasia with a rapid progression into acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 22, 849–851.
- Buchdunger, E., Cioffi, C.L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B.J., and Lydon, N.B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 139–145.

- Burt, R.K., Chen, Y. -h., Verda, L., Lucena, C., Navale, S., Johnson, J., Han, X., Lomasney, J., Baker, J.M., Ngai, K.-L., et al. (2012). Mitotically Inactivated Embryonic Stem Cells Can Be Used as an In Vivo Feeder Layer to Nurse Damaged Myocardium after Acute Myocardial Infarction: A Preclinical Study. *Circ. Res.* *111*, 1286–1296.
- Calabretta, B., and Perrotti, D. (2004). The biology of CML blast crisis. *Blood* *103*, 4010–4022.
- Canitrot, Y., Lautier, D., Laurent, G., Frechet, M., Ahmed, A., Turhan, A.G., Salles, B., Cazaux, C., and Hoffmann, J.S. (1999). Mutator phenotype of BCR– ABL transfected Ba/F 3 cell lines and its association with enhanced expression of DNA polymerase β . *Oncogene* *18*, 2676–2680.
- Cao, N., and Yao, Z.-X. (2011). The Hemangioblast: From Concept to Authentication. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* *294*, 580–588.
- Carella, A. (1991). Therapy of acute phase chronic myelogenous leukemia with intensive chemotherapy, blood cell autotransplant and cyclosporine A. *Leukemia* 517–521.
- Carette, J.E., Pruszk, J., Varadarajan, M., Blomen, V.A., Gokhale, S., Camargo, F.D., Wernig, M., Jaenisch, R., and Brummelkamp, T.R. (2010). Generation of iPSCs from cultured human malignant cells. *Blood* *115*, 4039–4042.
- Chanda, B., Ditadi, A., Iscove, N.N., and Keller, G. (2013). Retinoic Acid Signaling Is Essential for Embryonic Hematopoietic Stem Cell Development. *Cell* *155*, 215–227.
- Che, Y., Ye, F., Xu, R., Qing, H., Wang, X., Yin, F., Cui, M., Burstein, D., Jiang, B., and Zhang, D.Y. (2012). Co-Expression of XIAP and Cyclin D1 Complex Correlates with a Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Am. J. Pathol.* *180*, 1798–1807.
- Chen, Y., Hu, Y., Zhang, H., Peng, C., and Li, S. (2009). Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia. *Nat. Genet.* *41*, 783–792.
- Cheng, K., Kurzrock, R., Qiu, X., Estrov, Z., Ku, S., Dulski, K.M., Wang, J.Y.J., and Talpaz, M. (2002). Reduced focal adhesion kinase and paxillin phosphorylation in BCR-ABL-transfected cells. *Cancer* *95*, 440–450.
- Choi, K. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* *125*, 725–732.
- Choi, K. (2002). The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. *J. Hematother. Stem Cell Res.* *11*, 91–101.
- Chomel, J.-C., and Turhan, A.G. (2011). Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. *Oncotarget* *2*, 713–727.
- Chomel, J.-C., Bonnet, M.-L., Sorel, N., Bertrand, A., Meunier, M.-C., Fichelson, S., Melkus, M., Bennaceur-Griscelli, A., Guilhot, F., and Turhan, A.G. (2011). Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease. *Blood* *118*, 3657–3660.
- Chomel, J.-C., Aggoune, D., Sorel, N., and Turhan, A.G. (2014). Leucémie myéloïde chronique: Un modèle de dialogue entre la cellule souche leucémique et la niche hématopoïétique. *Médecine/Sciences* *30*, 452–461.

- Chu, S., McDonald, T., Lin, A., Chakraborty, S., Huang, Q., Snyder, D.S., and Bhatia, R. (2011). Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. *Blood* 118, 5565–5572.
- Clutterbuck, R.D., Newman, A., Powles, R., Catovsky, D., and Millar, J.L. (1997). G-CSF mobilization of haemopoietic cell populations in SCID mice engrafted with human leukaemia. *Bone Marrow Transplant.* 20, 325–332.
- Conte, E., Stagno, F., Guglielmo, P., Scuto, A., Consoli, C., and Messina, A. (2005). Survivin expression in chronic myeloid leukemia. *Cancer Lett.* 225, 105–110.
- Coppo, P., Dusanter-Fourt, I., Millot, G., Nogueira, M.M., Dugray, A., Bonnet, M.L., Mitjavila-Garcia, M.T., Le Pesteur, D., Guilhot, F., Vainchenker, W., et al. (2003). Constitutive and specific activation of STAT3 by BCR-ABL in embryonic stem cells. *Oncogene* 22, 4102–4110.
- Coppo, P., Flamant, S., Mas, V.D., Jarrier, P., Guillier, M., Bonnet, M.-L., Lacout, C., Guilhot, F., Vainchenker, W., and Turhan, A.G. (2006). BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells. *Br. J. Haematol.* 134, 171–179.
- Costa, G., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2012). Origin of blood cells and HSC production in the embryo. *Trends Immunol.* 33, 215–223.
- Daley, G.Q. (1990). Induction of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice by the P210bcr/abl Gene of the Philadelphia Chromosome. *Science.* Vol.247.
- Damjanov, I. (1971). Teratomas obtained through extrauterine growth of seven-day mouse embryos. *J Natl Cancer Inst.* 46(3), 471–5 passim.
- Dash, A.B., Williams, I.R., Kutok, J.L., Tomasson, M.H., Anastasiadou, E., Lindahl, K., Li, S., Van Etten, R.A., Borrow, J., Housman, D., et al. (2002). A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7622–7627.
- Deutsch, E., Dugray, A., AbdulKarim, B., Marangoni, E., Maggiorella, L., Vaganay, S., M’Kacher, R., Rasy, S.D., Eschwege, F., Vainchenker, W., et al. (2001). BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* 97, 2084–2090.
- Deutsch, E., Jarrousse, S., Buet, D., Dugray, A., Bonnet, M.-L., Vozenin-Brotons, M.-C., Guilhot, F., Turhan, A.G., Feunteun, J., and Bourhis, J. (2003). Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood* 101, 4583–4588.
- Dewamitta, S.R., Joseph, C., Purton, L.E., and Walkley, C.R. (2014). Erythroid-extrinsic regulation of normal erythropoiesis by retinoic acid receptors. *Br. J. Haematol.* 164, 280–285.
- Diekmann, D. (1991). BCR encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature.* 351.
- Dieterlen-Lièvre, F. (1984). Emergence of intraembryonic blood stem cells studied in avian chimeras by means of monoclonal antibodies. *Dev Comp Immunol. suppl* 3, 75–80.
- Ditadi, A., Sturgeon, C.M., Tober, J., Awong, G., Kennedy, M., Yzaguirre, A.D., Azzola, L., Ng, E.S., Stanley, E.G., French, D.L., et al. (2015). Human definitive haemogenic endothelium and arterial vascular endothelium represent distinct lineages. *Nat. Cell Biol.* 17, 580–591.

- Dkhissi, F., Aggoune, D., Pontis, J., Sorel, N., Piccirilli, N., LeCorf, A., Guilhot, F., Chomel, J.-C., Ait-Si-Ali, S., and Turhan, A.G. (2015). The downregulation of BAP1 expression by BCR-ABL reduces the stability of BRCA1 in chronic myeloid leukemia. *Exp. Hematol.* 43, 775–780.
- Druker, B.J. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cells. *Nat Med.* 2, 561–566.
- Dugray, A., Geay, J.F., Foudi, A., Bonnet, M.L., Vainchenker, W., Wendling, F., Louache, F., and Turhan, A.G. (2001). Rapid generation of a tetracycline-inducible BCR-ABL defective retrovirus using a single autoregulatory retroviral cassette. *Leukemia* 15, 1658–1662.
- Dzierzak, E., and Robin, C. (2010). Placenta as a source of hematopoietic stem cells. *Trends Mol. Med.* 16, 361–367.
- Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2008). Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* 9, 129–136.
- Eastham, A.M., Spencer, H., Soncin, F., Ritson, S., Merry, C.L.R., Stern, P.L., and Ward, C.M. (2007). Epithelial-Mesenchymal Transition Events during Human Embryonic Stem Cell Differentiation. *Cancer Res.* 67, 11254–11262.
- Eichmann, A. (1993). Two molecules related to the VEGF receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development. *Mech Develop.* 42, 33–48.
- Eiring, A.M., Khorashad, J.S., Morley, K., and Deininger, M.W. (2011). Advances in the treatment of chronic myeloid leukemia. *BMC Med.* 9, 1.
- Eisterer, W., Jiang, X., Christ, O., Glimm, H., Lee, K.H., Pang, E., Lambie, K., Shaw, G., Holyoake, T.L., Petzer, A.L., et al. (2005). Different subsets of primary chronic myeloid leukemia stem cells engraft immunodeficient mice and produce a model of the human disease. *Leukemia* 19, 435–441.
- Elefanty, A.G., Hariharan, I.K., and Cory, S. (1990). Bcr-Abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *EMBO J.* 9, 1069.
- Era, T., and Witte, O.N. (2000). Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 1737–1742.
- Evans et Kaufman (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* Vol 292, 154-156.
- Faloon, P., Arentson, E., Kazarov, A., Deng, C.X., Porcher, C., Orkin, S., and Choi, K. (2000). Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development* 127, 1931–1941.
- Feng, B., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.-H., Heng, J.-C.D., Chan, Y.-S., Yaw, L.-P., Zhang, W., Loh, Y.-H., Han, J., et al. (2009). Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat. Cell Biol.* 11, 197–203.
- Feng, Q., Lu, S.-J., Klimanskaya, I., Gomes, I., Kim, D., Chung, Y., Honig, G.R., Kim, K.-S., and Lanza, R. (2010). Hemangioblastic Derivatives from Human Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Limited Expansion and Early Senescence. *STEM CELLS* 28, 704–712.

- Fialkow, P.J., Gartler, S.M., and Yoshida, A. (1967). Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 58, 1468–1471.
- Flis, K., Irvine, D., Copland, M., Bhatia, R., and Skorski, T. (2012). Chronic myeloid leukemia stem cells display alterations in expression of genes involved in oxidative phosphorylation. *Leuk. Lymphoma* 53, 2474–2478.
- Foudi, A. (2006). Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4^{-/-} chimeric mice. *Blood* 107, 2243–2251.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 85, 348–362.
- Gale, N.W., Dominguez, M.G., Noguera, I., Pan, L., Hughes, V., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Adams, N.C., Lin, H.C., Holash, J., et al. (2004). Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15949–15954.
- Gaziev, D., Galimberti, M., Polchi, P., Angelucci, E., Giardini, C., Baronciani, D., Andreani, M., Persini, B., Erer, B., Sodani, P., et al. (2002). Fate of chronic myeloid leukemia patients treated with allogeneic bone marrow transplantation or chemotherapy and/or interferon at a single center: long-term results. *Bone Marrow Transplant.* 29, 1–8.
- Geay, J.-F., Buet, D., Zhang, Y., Foudi, A., Jarrier, P., Berthebaud, M., Turhan, A.G., Vainchenker, W., and Louache, F. (2005). p210BCR-ABL inhibits SDF-1 chemotactic response via alteration of CXCR4 signaling and down-regulation of CXCR4 expression. *Cancer Res.* 65, 2676–2683.
- Gertow, K., Hirst, C.E., Yu, Q.C., Ng, E.S., Pereira, L.A., Davis, R.P., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2013). WNT3A Promotes Hematopoietic or Mesenchymal Differentiation from hESCs Depending on the Time of Exposure. *Stem Cell Rep.* 1, 53–65.
- Graham, S.M., Jørgensen, H.G., Allan, E., Pearson, C., Alcorn, M.J., Richmond, L., and Holyoake, T.L. (2002). Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99, 319–325.
- Graham, S.M., Vass, J.K., Holyoake, T.L., and Graham, G.J. (2007). Transcriptional Analysis of Quiescent and Proliferating CD34⁺ Human Hemopoietic Cells from Normal and Chronic Myeloid Leukemia Sources. *Stem Cells* 25, 3111–3120.
- Grand, F., Kulkarni, S., Chase, A., Goldman, J.M., Gordon, M., and Cross, N.C. (1999). Frequent deletion of hSNF5/INI1, a component of the SWI/SNF complex, in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* 59, 3870–3874.
- Greuber, E.K., Smith-Pearson, P., Wang, J., and Pendergast, A.M. (2013). Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* 13, 559–571.
- Gritz, E., and Hirschi, K.K. (2016). Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1547–1567.

- Groffen, J. (1984). Philadelphia Chromosomal Breakpoints Are Clustered within a Limited Region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 36, 93–99.
- Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., and Daley, G.Q. (2011). Induced pluripotent stem cells — opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* Vol 10, 915-929.
- Guilhot, F., Chastang, C., Michallet, M., Guerci, A., Harousseau, J.-L., Maloisel, F., Bouabdallah, R., Guyotat, D., Cheron, N., Nicolini, F., et al. (1997). Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 337, 223–229.
- Gurdon (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology*. 4, 256-273.
- Haase, A., Olmer, R., Schwanke, K., Wunderlich, S., Merkert, S., Hess, C., Zweigerdt, R., Gruh, I., Meyer, J., Wagner, S., et al. (2009). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood. *Cell Stem Cell* 5, 434–441.
- Hadland, B.K., Varnum-Finney, B., Poulos, M.G., Moon, R.T., Butler, J.M., Rafii, S., and Bernstein, I.D. (2015). Endothelium and NOTCH specify and amplify aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest.* 125, 2032–2045.
- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462, 595–601.
- Hantschel, O., Warsch, W., Eckelhart, E., Kaupe, I., Grebien, F., Wagner, K.-U., Superti-Furga, G., and Sexl, V. (2012). BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia. *Nat. Chem. Biol.* 8, 285–293.
- Hawkins, K., Joy, S., and McKay, T. (2014). Cell signalling pathways underlying induced pluripotent stem cell reprogramming. *World J. Stem Cells* 6, 620–628.
- Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., Kolb, H.J., Pralle, H., Hossfeld, D.K., Queisser, W., Löffler, H., Heinze, B., and Georgii, A. (1993). Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood* 82, 398–407.
- Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., Kolb, H.J., Pralle, H., Hossfeld, D.K., Queisser, W., Löffler, H., Hochhaus, A., and Heinze, B. (1994). Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group [see comments]. *Blood* 84, 4064–4077.
- Herens, C., Tassin, F., Lemaire, V., Beguin, Y., Collard, E., Lampertz, S., Croisiau, C., Lecomte, M., De Prieck, B., Longree, L., et al. (2000). Deletion of the 5'-ABL region: a recurrent anomaly detected by fluorescence in situ hybridization in about 10% of Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia patients. *Br. J. Haematol.* 110, 214–216.
- Herrmann, H., Sadovnik, I., Cerny-Reiterer, S., Rulicke, T., Stefanzi, G., Willmann, M., Hoermann, G., Bilban, M., Blatt, K., Herndlhofer, S., et al. (2014). Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood* 123, 3951–3962.

- His, W. (1900). Lecithoblast und angioblast der wirbelthiere. *Abhandl KS Ges Wis Math-Phys.* 22, 171–328.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Cook, E.G., Gao, Q., Mitalipova, M., and Jaenisch, R. (2008). A Drug-Inducible System for Direct Reprogramming of Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* 3, 346–353.
- Hu, Y., and Li, S. (2016). Survival regulation of leukemia stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1039–1050.
- Hu, K., Yu, J., Suknuntha, K., Tian, S., Montgomery, K., Choi, K.-D., Stewart, R., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2011). Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood* 117, e109-119.
- Huber, T. (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature. Vol* 432, 625–630.
- Huettner, C.S., Zhang, P., Van Etten, R.A., and Tenen, D.G. (2000). Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR–ABL1. *Nat. Genet.* 24, 57–60.
- Huntly, B.J., Reid, A.G., Bench, A.J., Campbell, L.J., Telford, N., Shepherd, P., Szer, J., Prince, H.M., Turner, P., Grace, C., et al. (2001). Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* 98, 1732–1738.
- Huntly, B.J., Bench, A.J., Delabesse, E., Reid, A.G., Li, J., Scott, M.A., Campbell, L., Byrne, J., Pinto, E., Brizard, A., et al. (2002). Derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia: poor prognosis is not associated with loss of ABL-BCR expression, elevated BCR-ABL levels, or karyotypic instability. *Blood* 99, 4547–4553.
- Ichimaru, M. (1991). Atomic Bomb and Leukemia. *J. RADIAT. RES. Suppl* 2, 14–19.
- Issaad, C., Ahmed, M., Novault, S., Bonnet, M.L., Bennardo, T., Varet, B., Vainchenker, W., and Turhan, A.G. (2000). Biological effects induced by variable levels of BCR-ABL protein in the pluripotent hematopoietic cell line UT-7. *Leukemia* 14, 662–670.
- Jabbour, E., and Kantarjian, H. (2014). Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am. J. Hematol.* 89, 547–556.
- Jagannathan-Bogdan, M., and Zon, L.I. (2013). Hematopoiesis. *Development* 140, 2463–2467.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771–775.
- Kantarjian, H. (1987). Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med.* 83(3), 445–454.
- Kaufman, D.S., Hanson, E.T., Lewis, R.L., Auerbach, R., and Thomson, J.A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10716–10721.

- Kelliher, M.A., McLaughlin, J., Witte, O.N., and Rosenberg, N. (1990). Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 6649–6653.
- Kennedy, M., D'Souza, S.L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S., and Keller, G. (2007). Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* 109, 2679–2687.
- Kim, J., Lengner, C.J., Kirak, O., Hanna, J., Cassady, J.P., Lodato, M.A., Wu, S., Faddah, D.A., Steine, E.J., Gao, Q., et al. (2011). Reprogramming of Postnatal Neurons into Induced Pluripotent Stem Cells by Defined Factors. *STEM CELLS* 29, 992–1000.
- Kinstrie, R. (2015). 49 CD93 Is a Novel Biomarker of Leukemia Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia. (Orlando: ASH), p. 126:49.
- Koptyra, M., Cramer, K., Slupianek, A., Richardson, C., and Skorski, T. (2008). BCR/ABL promotes accumulation of chromosomal aberrations induced by oxidative and genotoxic stress. *Leukemia* 22, 1969–1972.
- Koschmieder, S., Göttgens, B., Zhang, P., Iwasaki-Arai, J., Akashi, K., Kutok, J.L., Dayaram, T., Geary, K., Green, A.R., Tenen, D.G., et al. (2005). Inducible chronic phase of myeloid leukemia with expansion of hematopoietic stem cells in a transgenic model of BCR-ABL leukemogenesis. *Blood* 105, 324–334.
- Krause, D.S., Lazarides, K., von Andrian, U.H., and Van Etten, R.A. (2006). Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL–expressing leukemic stem cells. *Nat. Med.* 12, 1175–1180.
- Kumano, K., Arai, S., Hosoi, M., Taoka, K., Takayama, N., Otsu, M., Nagae, G., Ueda, K., Nakazaki, K., Kamikubo, Y., et al. (2012). Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood* 119, 6234–6242.
- Kumano, K., Arai, S., and Kurokawa, M. (2013). Generation of iPS cells from normal and malignant hematopoietic cells. *Int. J. Hematol.* 98, 145–152.
- Kurokawa, M., Mitani, K., Imai, Y., Ogawa, S., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1998). The t (3; 21) fusion product, AML1/Evi-1, interacts with Smad3 and blocks transforming growth factor- β –mediated growth inhibition of myeloid cells. *Blood* 92, 4003–4012.
- Kyba, M., Perlingeiro, R.C., and Daley, G.Q. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* 109, 29–37.
- Kyba, M., Perlingeiro, R.C., Hoover, R.R., Lu, C.-W., Pierce, J., and Daley, G.Q. (2003). Enhanced hematopoietic differentiation of embryonic stem cells conditionally expressing Stat5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 11904–11910.
- L Thompson, H., and O Manilay, J. (2011). Embryonic stem cell-derived hematopoietic stem cells: challenges in development, differentiation, and immunogenicity. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 1621–1637.
- Labastie, M.-C., Cortés, F., Roméo, P.-H., Dulac, C., and Péault, B. (1998). Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood* 92, 3624–3635.

- Lange, R. (1954). Leukemia in Atomic Bomb Survivors I. General Observations. *Blood*. 9, 574–585.
- Lee, S.-E., Choi, S.Y., Song, H.-Y., Kim, S.-H., Choi, M.-Y., Park, J.S., Kim, H.-J., Kim, S.-H., Zang, D.Y., Oh, S., et al. (2016). Imatinib withdrawal syndrome and longer duration of imatinib have a close association with a lower molecular relapse after treatment discontinuation: the KID study. *Haematologica* 101, 717–723.
- Lenggerke, C., Schmitt, S., Bowman, T.V., Jang, I.H., Maouche-Chretien, L., McKinney-Freeman, S., Davidson, A.J., Hammerschmidt, M., Rentzsch, F., Green, J.B.A., et al. (2008). BMP and Wnt Specify Hematopoietic Fate by Activation of the Cdx-Hox Pathway. *Cell Stem Cell* 2, 72–82.
- Li, J., Song, W., Pan, G., Zhou, J., and others (2014). Advances in understanding the cell types and approaches used for generating induced pluripotent stem cells. *J Hematol Oncol* 7, 50.
- Lin, F., Monaco, G., Sun, T., Liu, J., Lin, H., Stephens, C., Belmont, J., and Arlinghaus, R.B. (2001). BCR gene expression blocks Bcr-Abl induced pathogenicity in a mouse model. *Oncogene* 20, 1873–1881.
- Loi n° 2013-715 LOI n° 2013-715 du 6 août 2013 tendant à modifier la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique en autorisant sous certaines conditions la recherche sur l’embryon et les cellules souches embryonnaires | Legifrance.
- Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T., and Plath, K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 2883–2888.
- Lozzio, C.B., and Lozzio, B.B. (1975). Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line With Positive Philadelphia Chromosome. *Blood*. Vol. 45, No.3, 321-334.
- Lu, S.-J., Feng, Q., Caballero, S., Chen, Y., Moore, M.A.S., Grant, M.B., and Lanza, R. (2007). Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat. Methods* 4, 501–509.
- Lugo, T. (1990). Tyrosine Kinase Activity and Transformation Potency of bcr-abl Oncogene Products. *Science*. Vol 247, 1079-1082.
- Lugus, J.J., Chung, Y.S., Mills, J.C., Kim, S.-I., Grass, J.A., Kyba, M., Doherty, J.M., Bresnick, E.H., and Choi, K. (2007). GATA2 functions at multiple steps in hemangioblast development and differentiation. *Development* 134, 393–405.
- Maekawa, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T., Shibukawa, R., Kodanaka, I., Ichisaka, T., Kawamura, Y., Mochizuki, H., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2011). Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* 474, 225–229.
- Mahon, F.-X., Réa, D., Guilhot, J., Guilhot, F., Huguet, F., Nicolini, F., Legros, L., Charbonnier, A., Guerci, A., Varet, B., et al. (2010). 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.* 11, 1029–1035.
- Mahon, G.M., Wang, Y., Korus, M., Kostenko, E., Cheng, L., Sun, T., Arlinghaus, R.B., and Whitehead, I.P. (2003). The c-Myc oncoprotein interacts with Bcr. *Curr. Biol.* 13, 437–441.

- Mandal, L. (2004). Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonad-mesonephros mesoderm. *Nat Genet.* 36, 1019–1023.
- Mansour, A.A., Gafni, O., Weinberger, L., Zviran, A., Ayyash, M., Rais, Y., Krupalnik, V., Zerbib, M., Amann-Zalcenstein, D., Maza, I., et al. (2012). The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature* 488, 409–413.
- Marcelo, K.L., Sills, T.M., Coskun, S., Vasavada, H., Sanglikar, S., Goldie, L.C., and Hirschi, K.K. (2013). Hemogenic Endothelial Cell Specification Requires c-Kit, Notch Signaling, and p27-Mediated Cell-Cycle Control. *Dev. Cell* 27, 504–515.
- Marshall, C.J., Moore, R.L., Thorogood, P., Brickell, P.M., Kinnon, C., and Thrasher, A.J. (1999). Detailed characterization of the human aorta-gonad-mesonephros region reveals morphological polarity resembling a hematopoietic stromal layer. *Dev. Dyn.* 215, 139–147.
- Maru, Y. (1991). The BCR Gene Encodes a Novel Serine/Threonine Kinase Activity within a Single Exon. *Cell.* 67, 459–468.
- Melkus, M., Bennaceur-Griscelli, A., Valogne, Y., Flamant, S., Chomel, J.-C., Sorel, N., Bonnet, M.-L., Deininger, M.W., Mitjavila-Garcia, M.-T., and Turhan, A.G. (2013). Biological effects of T315I-mutated BCR-ABL in an embryonic stem cell-derived hematopoiesis model. *Exp. Hematol.* 41, 335–345.e3.
- Melo, J.V., Gordon, D.E., Cross, N.C., and Goldman, J.M. (1993). The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* 81, 158–165.
- Menasché, P., and Vanneaux, V. (2016). Stem cells for the treatment of heart failure. *Curr. Res. Transl. Med.* 64, 97–106.
- Metcalf, D. (2010). Multipotential hematopoietic blast colony-forming cells exhibit delays in self-generation and lineage commitment. *PNAS.* 107, 16257–16261.
- Modugno, M. (2014). New resistance mechanisms for small molecule kinase inhibitors of Abl kinase. *Drug Discov. Today Technol.* 11, 5–10.
- Molotkov, A., Molotkova, N., and Duester, G. (2005). Retinoic acid generated by Raldh2 in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development. *Dev. Dyn.* 232, 950–957.
- Moore, M., and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br. J. Haematol.* 18, 279–296.
- Mughal, T.I., Radich, J.P., Deininger, M.W., Apperley, J.F., Hughes, T.P., Harrison, C.J., Gambacorti-Passerini, C., Saglio, G., Cortes, J., and Daley, G.Q. (2016). Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica* 101, 541–558.
- Murray (1932). The development in vitro of the blood of the early chick embryo. *P Roy Soc B Biol Sci.* 11, 497–521.
- Nakanishi, T. (2006). Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. *Blood* 108, 678–684.

- Nakano, H., Liu, X., Arshi, A., Nakashima, Y., van Handel, B., Sasidharan, R., Harmon, A.W., Shin, J.-H., Schwartz, R.J., Conway, S.J., et al. (2013). Haemogenic endocardium contributes to transient definitive haematopoiesis. *Nat. Commun.* 4, 1564.
- Naldini, L., Stacchini, A., Cirillo, D.M., Aglietta, M., Gavosto, F., and Comoglio, P.M. (1986). Phosphotyrosine antibodies identify the p210c-abl tyrosine kinase and proteins phosphorylated on tyrosine in human chronic myelogenous leukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1803–1811.
- Nestal de Moraes, G., Souza, P.S., Costas, F.C. de F., Vasconcelos, F.C., Reis, F.R.S., and Maia, R.C. (2012). The Interface between BCR-ABL-Dependent and -Independent Resistance Signaling Pathways in Chronic Myeloid Leukemia. *Leuk. Res. Treat.* 2012, 1–19.
- Nieborowska-Skorska, M., Kopinski, P.K., Ray, R., Hoser, G., Ngaba, D., Flis, S., Cramer, K., Reddy, M.M., Koptyra, M., Penserga, T., et al. (2012). Rac2-MRC-cIII-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors. *Blood* 119, 4253–4263.
- Nishikawa, S.-I., Nishikawa, S., Kawamoto, H., Yoshida, H., Kizumoto, M., Kataoka, H., and Katsura, Y. (1998). In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* 8, 761–769.
- North, T.E., De Bruijn, M.F., Stacy, T., Talebian, L., Lind, E., Robin, C., Binder, M., Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2002). Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity* 16, 661–672.
- Nowell, P., and Hungerford, D. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst.* 25, 85–109.
- Oberlin, E. (2002). Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development.* 129, 4147–4157.
- O’Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J.J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., et al. (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348, 994–1004.
- Oh, D., Han, S., Seo, J., Lee, J.-R., Choi, J., Groffen, J., Kim, K., Cho, Y.S., Choi, H.-S., Shin, H., et al. (2010). Regulation of Synaptic Rac1 Activity, Long-Term Potentiation Maintenance, and Learning and Memory by BCR and ABR Rac GTPase-Activating Proteins. *J. Neurosci.* 30, 14134–14144.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.
- Okuda, K., Weisberg, E., Gilliland, D.G., and Griffin, J.D. (2001). ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 97, 2440–2448.
- Palis, J., Malik, J., McGrath, K.E., and Kingsley, P.D. (2010). Primitive erythropoiesis in the mammalian embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1011–1018.
- Pan, C., Lu, B., Chen, H., and Bishop, C.E. (2010). Reprogramming human fibroblasts using HIV-1 TAT recombinant proteins OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC. *Mol. Biol. Rep.* 37, 2117–2124.

- Pasternak, G., Hochhaus, A., Schultheis, B., and Hehlmann, R. (1998). Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124, 643–660.
- Pendergast, A.M., Muller, A.J., Havlik, M.H., Clark, R., McCormick, F., and Witte, O.N. (1991). Evidence for regulation of the human ABL tyrosine kinase by a cellular inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 5927–5931.
- Perlingeiro, R.C., Kyba, M., and Daley, G.Q. (2001). Clonal analysis of differentiating embryonic stem cells reveals a hematopoietic progenitor with primitive erythroid and adult lymphoid-myeloid potential. *Development* 128, 4597–4604.
- Perrotti, D., Jamieson, C., Goldman, J., and Skorski, T. (2010). Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J. Clin. Invest.* 120, 2254–2264.
- Peters, D.G., Klucher, K.M., Perlingeiro, R.C., Dessain, S.K., Koh, E.Y., and Daley, G.Q. (2001). Autocrine and paracrine effects of an ES-cell derived, BCR/ABL-transformed hematopoietic cell line that induces leukemia in mice. *Oncogene* 20, 2636–2646.
- Phan, C.-L., Megat Baharuddin, P.J.N.B., Chin, L.-P., Zakaria, Z., Yegappan, S., Sathar, J., Tan, S.-M., Purushothaman, V., and Chang, K.-M. (2008). Amplification of BCR–ABL and t(3;21) in a patient with blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 180, 60–64.
- Poplawski, T., and Blasiak, J. (2010). BCR/ABL downregulates DNA-PKCS-dependent and upregulates backup non-homologous end joining in leukemic cells. *Mol. Biol. Rep.* 37, 2309–2315.
- Quintás-Cardama, A., and Cortes, J. (2009). Molecular biology of bcr-abl1–positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 113, 1619–1630.
- Radomska, H.S., Satterthwaite, A.B., Burn, T.C., Oliff, I.A., and Tenen, D.G. (1998). Multiple control elements are required for expression of the human CD34 gene. *Gene* 222, 305–318.
- Radziwill, G., Erdmann, R.A., Margelisch, U., and Moelling, K. (2003). The Bcr Kinase Downregulates Ras Signaling by Phosphorylating AF-6 and Binding to Its PDZ Domain. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4663–4672.
- Redell, M.S., Ruiz, M.J., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., and Tweardy, D.J. (2011). Stat3 signaling in acute myeloid leukemia: ligand-dependent and -independent activation and induction of apoptosis by a novel small-molecule Stat3 inhibitor. *Blood* 117, 5701–5709.
- Redmer, T., Diecke, S., Grigoryan, T., Quiroga-Negreira, A., Birchmeier, W., and Besser, D. (2011). E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep.* 12, 720–726.
- Reid, A.G., Huntly, B.J., Hennig, E., Niederwieser, D., Campbell, L.J., Bown, N., Telford, N., Walker, H., Grace, C.D., Deininger, M.W., et al. (2002). Deletions of the derivative chromosome 9 do not account for the poor prognosis associated with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99, 2274–2275.
- Ren, R. (2005). Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 5, 172–183.

- Ress, A., and Moelling, K. (2005). Bcr is a negative regulator of the Wnt signalling pathway. *EMBO Rep.* 6, 1095–1100.
- Reuther, J.Y., Reuther, G.W., Cortez, D., Pendergast, A.M., and Baldwin, A.S. (1998). A requirement for NF- κ B activation in Bcr–Abl-mediated transformation. *Genes Dev.* 12, 968–981.
- Richard, C., Drevon, C., Canto, P.-Y., Villain, G., Boll  rot, K., Lempereur, A., Teillet, M.-A., Vincent, C., Rossell   Castillo, C., Torres, M., et al. (2013). Endothelio-Mesenchymal Interaction Controls runx1 Expression and Modulates the notch Pathway to Initiate Aortic Hematopoiesis. *Dev. Cell* 24, 600–611.
- Robert-Moreno,   ., Guiu, J., Ruiz-Herguido, C., L  pez, M.E., Ingl  s-Esteve, J., Riera, L., Tipping, A., Enver, T., Dzierzak, E., Gridley, T., et al. (2008). Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1. *EMBO J.* 27, 1886–1895.
- Roche-Lestienne, C., and Preudhomme, C. (2003). Mutations in the ABL kinase domain pre-exist the onset of imatinib treatment. *Semin. Hematol.* 40, 80–82.
- Rosenberg, N. (1989). wepowefi was owe. *Adv. Virus Res.* 35, 39.
- Ross, D.M., Branford, S., Seymour, J.F., Schwarzer, A.P., Arthur, C., Yeung, D.T., Dang, P., Goyne, J.M., Slader, C., Filshie, R.J., et al. (2013). Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* 122, 515–522.
- Rowley, J. (1973). A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature.* 243,290-293.
- Ruiz-Herguido, C., Guiu, J., D’Altri, T., Ingl  s-Esteve, J., Dzierzak, E., Espinosa, L., and Bigas, A. (2012). Hematopoietic stem cell development requires transient Wnt/ β -catenin activity. *J. Exp. Med.* 209, 1457–1468.
- Sabin, F. (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contrib Embryol.* 9, 213–262.
- Sadarangani, A., Pineda, G., Lennon, K.M., Chun, H.-J., Shih, A., Schairer, A.E., Court, A.C., Goff, D.J., Prashad, S.L., Geron, I., et al. (2015). GLI2 inhibition abrogates human leukemia stem cell dormancy. *J. Transl. Med.* 13, 98.
- Sadovnik, I., Hoelbl-Kovacic, A., Herrmann, H., Eisenwort, G., Cerny-Reiterer, S., Warsch, W., Hoermann, G., Greiner, G., Blatt, K., Peter, B., et al. (2016). Identification of CD25 as STAT5-Dependent Growth Regulator of Leukemic Stem Cells in Ph+ CML. *Clin. Cancer Res.* 22, 2051–2061.
- Samanta, A., Perazzona, B., Chakraborty, S., Sun, X., Modi, H., Bhatia, R., Priebe, W., and Arlinghaus, R. (2011). Janus kinase 2 regulates Bcr–Abl signaling in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 25, 463–472.
- Sawyers, C.L. (1993). The Role of MYC in Transformation by BCR-ABL. *Leuk. Lymphoma* 11, 45–46.
- Sawyers, C.L. (1994). The Nuclear Tyrosine Kinase c-Abl Negatively Regulates Cell Growth. *Cell* 77, 121–131.

- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 7–25.
- Schwalbe, J. (1901). Virchow-bibliographie. 1843-1901 (G. Reimer).
- Schwartzberg, P. (1991). Mice Homozygous for the abl m1 Mutation Show Poor Viability and Depletion of Selected B and T Cell Populations. *Cell*. 65, 1165-1175.
- Shet, A.S., Jahagirdar, B.N., and Verfaillie, C.M. (2002). Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* 16, 1402–1411.
- Shields, A. (1979). Structure of the Abelson Murine Leukemia Virus Genome. *Cell* 18, 955–962.
- Shields, A., Rosenberg, N., and Baltimore, D. (1979). Virus production by Abelson murine leukemia virus-transformed lymphoid cells. *J. Virol.* 31, 557–567.
- Silva, K.L., de Souza, P.S., Nestal de Moraes, G., Moellmann-Coelho, A., Vasconcelos, F. da C., and Maia, R.C. (2013). XIAP and P-glycoprotein co-expression is related to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.* 37, 1350–1358.
- Skorski, T. (2002). BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene*. 21, 8591–8604.
- Slukvin, I.I. (2013). Deciphering the hierarchy of angiohematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells. *Cell Cycle* 12, 720–727.
- Slupianek, A., Gurdek, E., Koptyra, M., Nowicki, M.O., Siddiqui, K.M., Groden, J., and Skorski, T. (2005). BLM helicase is activated in BCR/ABL leukemia cells to modulate responses to cisplatin. *Oncogene* 24, 3914–3922.
- Slupianek, A., Poplawski, T., Jozwiakowski, S.K., Cramer, K., Pytel, D., Stoczynska, E., Nowicki, M.O., Blasiak, J., and Skorski, T. (2011). BCR/ABL Stimulates WRN to Promote Survival and Genomic Instability. *Cancer Res.* 71, 842–851.
- Smith, K.P., Luong, M.X., and Stein, G.S. (2009). Pluripotency: Toward a gold standard for human ES and iPS cells. *J. Cell. Physiol.* 220, 21–29.
- Sommer, C.A., Gianotti Sommer, A., Longmire, T.A., Christodoulou, C., Thomas, D.D., Gostissa, M., Alt, F.W., Murphy, G.J., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G. (2009). Excision of Reprogramming Transgenes Improves the Differentiation Potential of iPS Cells Generated with a Single Excisable Vector. *Stem Cells* N/A-N/A.
- Sorel, N., Mayeur-Rousse, C., Deverrière, S., Roy, L., Brottier-Mancini, E., Guilhot, F., Turhan, A.G., and Chomel, J.C. (2010). Comprehensive Characterization of a Novel Intronic Pseudo-Exon Inserted within an e14/a2 BCR-ABL Rearrangement in a Patient with Chronic Myeloid Leukemia. *J. Mol. Diagn.* 12, 520–524.
- Soverini, S., Colarossi, S., Gnani, A., Rosti, G., Castagnetti, F., Poerio, A., Iacobucci, I., Amabile, M., Abruzzese, E., Orlandi, E., et al. (2006). Contribution of ABL Kinase Domain Mutations to Imatinib Resistance in Different Subsets of Philadelphia-Positive Patients: By the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 12, 7374–7379.

- Stadtfield, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science* 322, 945–949.
- Stamatovic, D., Balint, B., Tukic, L., Elez, M., Tarabar, O., Todorovic, M., Todoric-Zivanovic, B., Ostojic, G., Tatomirovic, Z., Marjanovic, S., et al. (2012). Allogeneic stem cell transplant for chronic myeloid leukemia as a still promising option in the era of the new target therapy. *Vojnosanit. Pregl.* 69, 37–42.
- Suknuntha, K., Ishii, Y., Tao, L., Hu, K., McIntosh, B.E., Yang, D., Swanson, S., Stewart, R., Wang, J.Y.J., Thomson, J., et al. (2015). Discovery of survival factor for primitive chronic myeloid leukemia cells using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 15, 678–693.
- Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsell-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M., and Montgomery, K.D. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 313–314.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.
- Tanabe, K., Nakamura, M., Narita, M., Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2013). Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 12172–12179.
- Tavian, M., and Peault, B. (2005). The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero. *Exp. Hematol.* 33, 1062–1069.
- Tavian, M., Coulombel, L., Luton, D., Clemente, H.S., Dieterlen-Lievre, F., and Peault, B. (1996). Aorta-associated CD34⁺ hematopoietic cells in the early human. *Blood* 87, 67–72.
- Tavian, M., Robin, C., Coulombel, L., and Péault, B. (2001). The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity* 15, 487–495.
- Telliam, G., Féraud, O., Griscelli, F., Opolon, P., Divers, D., Bennaceur-Griscelli, A., and Turhan, A.G. (2016). Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with chronic myeloid leukemia (CML) resistant to targeted therapies. *Stem Cell Res.* 17, 235–237.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Tremml, G., Singer, M., and Malavarca, R. (2008). Culture of Mouse Embryonic Stem Cells. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p. Current Protocols in Stem Cell Biology *Suppl* 5.
- Turhan, A. (2011). BCR (Breakpoint cluster region). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*
- Tybulewicz, V.L.. (1991). Neonatal Lethality and Lymphopenia in Mice with a Homozygous Disruption of the c-abl Proto-Oncogene. 1153–1163.

- Van Etten, R.A., Jackson, P., and Baltimore, D. (1989). The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability. *Cell* 58 4.
- Viswanathan, S.R., Powers, J.T., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, T.L., Toffanin, S., O'Sullivan, M., Lu, J., Phillips, L.A., Lockhart, V.L., et al. (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat. Genet.* 41, 843–848.
- Vodyanik, M.A. (2005). Human embryonic stem cell-derived CD34⁺ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 105, 617–626.
- Vogeli, K. (2006). A common pro- genitor for hematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula. *Nature* 443, 337–339.
- Wafa, A., Asa'ad, M., Ikhtiar, A., Liehr, T., and Al-Achkar, W. (2015). Deletion 9p23 to 9p11.1 as sole additional abnormality in a Philadelphia positive chronic myeloid leukemia in blast crisis: a rare event. *Mol. Cytogenet.* 8.
- Wang, Z., Yuan, H., Roth, M., Stark, J.M., Bhatia, R., and Chen, W.Y. (2013). SIRT1 deacetylase promotes acquisition of genetic mutations for drug resistance in CML cells. *Oncogene* 32, 589–598.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630.
- Waskow, C. (2004). Rescue of lethal c-Kit^{W/W} mice by erythropoietin. *Blood* 104, 1688–1695.
- Weerkamp, F., Dekking, E., Ng, Y.Y., Van der Velden, V.H.J., Wai, H., Böttcher, S., Brüggemann, M., Van der Sluijs, A.J., Koning, A., Boeckx, N., et al. (2009). Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR–ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia* 23, 1106–1117.
- Wick, R.R., Nekolla, E.A., Gaubitz, M., and Schulte, T.L. (2008). Increased risk of myeloid leukaemia in patients with ankylosing spondylitis following treatment with radium-224. *Rheumatology* 47, 855–859.
- Wilmot, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, 64–66.
- Witte, O.N., Rosenberg, N., Paskind, M., Shields, A., and Baltimore, D. (1978). Identification of an Abelson murine leukemia virus-encoded protein present in transformed fibroblast and lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2488–2492.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Härmäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766–770.
- Xie, S., Wang, Y., Liu, J., Sun, T., Wilson, M.B., Smithgall, T.E., and Arlinghaus, R.B. (2001). Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene* 20, 6188–6195.
- Xiong, J.-W. (2008). Molecular and developmental biology of the hemangioblast. *Dev. Dyn.* 237, 1218–1231.
- Xu, Y. (2006). Immunophenotypic identification of acute myeloid leukemia with monocytic differentiation. *Leukemia* 20, 1321–1324.

- Yakubov, E., Rechavi, G., Rozenblatt, S., and Givol, D. (2010). Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 189–193.
- Yang, X.-H., Feng, Z.-E., Yan, M., Hanada, S., Zuo, H., Yang, C.-Z., Han, Z.-G., Guo, W., Chen, W.-T., and Zhang, P. (2012). XIAP Is a Predictor of Cisplatin-Based Chemotherapy Response and Prognosis for Patients with Advanced Head and Neck Cancer. *PLoS ONE* 7, e31601.
- Ye, D. (2006). STAT5 signaling is required for the efficient induction and maintenance of CML in mice. *Blood* 107, 4917–4925.
- Yoshimoto, M., Montecino-Rodriguez, E., Ferkowicz, M.J., Porayette, P., Shelley, W.C., Conway, S.J., Dorshkind, K., and Yoder, M.C. (2011). Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 1468–1473.
- Yu, C., Liu, Y., Miao, Z., Yin, M., Lu, W., Lv, Y., Ding, M., and Deng, H. (2010). Retinoic acid enhances the generation of hematopoietic progenitors from human embryonic stem cell-derived hemato-vascular precursors. *Blood* 116, 4786–4794.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science* 324, 797–801.
- Yuan, H., Wang, Z., Li, L., Zhang, H., Modi, H., Horne, D., Bhatia, R., and Chen, W. (2012). Activation of stress response gene SIRT1 by BCR-ABL promotes leukemogenesis. *Blood* 119, 1904–1914.
- Zhao, K., Yin, L.-L., Zhao, D.-M., Pan, B., Chen, W., Cao, J., Cheng, H., Li, Z.-Y., Li, D.-P., Sang, W., et al. (2013). IL1RAP as a surface marker for leukemia stem cells is related to clinical phase of chronic myeloid leukemia patients. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 4787–4798.
- Zhou, J. (2014). Identification and targeting leukemia stem cells: The path to the cure for acute myeloid leukemia. *World J. Stem Cells* 6, 473.
- Zhou, F., Xu, J., Ding, G., and Cao, L. (2014). Overexpressions of CK2 β and XIAP are Associated with Poor Prognosis of Patients with Cholangiocarcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* 20, 73–79.