Evaluation du rôle de la niche hématopoïétique dans l'induction des syndromes myélodysplasiques : rôle de dicer1 et du stress oxydatif

Mathieu Meunier

▶ **To cite this version:**

Mathieu Meunier. Evaluation du rôle de la niche hématopoïétique dans l'induction des syndromes myélodysplasiques : rôle de dicer1 et du stress oxydatif. Santé. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAS014 . tel-02372468

HAL Id: tel-02372468

https://theses.hal.science/tel-02372468v1

Submitted on 20 Nov 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.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : MBS - Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Mathieu MEUNIER

Thèse dirigée par **Sophie PARK**, Communauté Université Grenoble Alpes

préparée au sein du **Laboratoire CRI IAB - Centre de Recherche Oncologie/Développement - Institute for Advanced Biosciences**
dans **l'École Doctorale Ingénierie pour la santé la Cognition et l'Environnement**

Evaluation du rôle de la niche hématopoïétique dans l'induction des syndromes myélodysplasiques: rôle de dicer1 et du stress oxydatif

The implication of hematopoietic niche in induction of myelodysplastic syndromes: the role of Dicer1 and oxidative stress

Thèse soutenue publiquement le **5 avril 2018**,
devant le jury composé de :

Madame SOPHIE PARK
PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., CHU GRENOBLE ALPES, Directeur de thèse
Madame CATHERINE LACOMBE
PROFESSEUR EMERITE, ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS, Examinateur
Monsieur PIERRE HAINAUT
PROFESSEUR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Examinateur
Madame PATRICIA AGUILAR MARTINEZ
PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE DE MONTPELLIER, Rapporteur
Monsieur JEAN-FRANÇOIS PEYRON
DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE DE NICE, Rapporteur
Monsieur JEAN-YVES CAHN
PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., CHU GRENOBLE ALPES, Président

REMERCIEMENTS

Je remercie Madame Patricia Aguilar-Martinez, Madame Catherine Lacombe, Monsieur Jean-François Peyron et Monsieur Pierre Hainaut pour avoir accepté d'être membre du jury. Merci pour le temps que vous avez consacré à lire et évaluer mon travail de thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de l'Université Grenoble Alpes et l'association ARAMIS Alpes qui m'ont permis grâce à une allocation d'une bourse de me consacrer sereinement et entièrement à l'élaboration de ma thèse.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse, Madame le professeur Sophie Park, pour son soutien, sa grande disponibilité, sa patience et ses nombreux conseils tout au long ce projet de thèse. Que de chemin parcouru en 4 ans, quand on sait qu'au moment de mon arrivée au laboratoire, je n'arrivais pas même à faire la mise au point de mes cellules avec le microscope.

Je tiens également à remercier Monsieur le professeur Jean-Yves Cahn qui m'a accueilli au sein de l'équipe d'hématologues du CHU de Grenoble et qui m'a témoigné de nombreuses fois sa confiance.

Je tiens aussi à adresser mes sincères remerciements à Monsieur Jean Marc Moulis pour sa grande contribution à ce projet et ainsi qu'à toutes ses anecdotes qui ont égayé les longues heures de manipulation au LBFA.

Je veux aussi remercier toutes les techniciennes des laboratoires d'hématologie cellulaire, de biologie moléculaire et de cytogénétique : Anne, Laurianne, Rachel, Camille, Isabelle, Céline, Emilie, Anne et Nathalie pour leur aide, leur soutien logistique en gâteaux et sucreries ainsi que pour leur bonne humeur au quotidien. Je souhaite aussi remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger et manipuler durant cette thèse notamment Audrey et Jean Paul qui m'ont beaucoup appris sur la transcriptomique et la biologie moléculaire. Julie avec qui j'ai approfondi mes connaissances sur les NOX et la cytométrie en flux.

Enfin merci à mes parents, à mon petit frère Romain et mes deux petites sœurs Mélody et May pour votre soutien et vos encouragements même si mon envie de faire cette thèse vous a toujours paru un peu obscur. Un grand merci à Laure, ma compagne, pour les sacrifices et le soutien pour mener à bien ce projet. Merci à mon fils Hugo qui est arrivé pendant cette thèse et qui l'a gentiment agrémentée de quelques nuits blanches mais surtout de beaucoup de bonheur. Merci à tous ceux qui m'ont soutenu dans les moments difficiles notamment toi Natacha.

RESUME

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont dus à une atteinte oligoclonale de la cellule souche hématopoïétique aboutissant à une dysplasie des lignées myéloïdes, des cytopénies sanguines et une évolution fréquente vers la leucémie aiguë. De nombreuses mutations décrites dans des gènes contrôlant la régulation épigénétique sont responsables de la genèse des SMD. Mais des travaux récents montrent également que des anomalies du microenvironnement médullaire, notamment des cellules stromales mésenchymateuses (CSM), peuvent induire et propager un SMD suggérant l'idée d'une communication intercellulaire étroite entre la niche et les cellules hématopoïétiques. L'invalidation du gène *Dicer1* (RNASE de type III impliquée dans le processing des microARN) dans les progéniteurs ostéoblastiques murins induit un véritable SMD avec dysmyélopoïèse.

Nous avons confirmé la sous-expression de DICER1 dans les CSM SMD à partir de prélèvements primaires de moelle totale et dans les CSM en expansion. Cette sous-expression de DICER1 s'accompagne d'une dérégulation du profil des microARN au sein de CSM SMD mise en évidence par étude transcriptomique des CSM SMD vs CSM témoins. Nous avons découvert une possible cible thérapeutique : le miR-486-5p que nous avons retrouvé constamment surexprimé dans les CSM SMD. Un des moyens pour les CSM d'influer sur les cellules souches hématopoïétiques peut se faire par la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs). Ces EVs sont hétérogènes et peuvent être définies par leur taille. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux petites vésicules extracellulaires (sEVs) contenant la fraction exosomale qui est connue comme pouvant transporter des microARN, ARNm et des protéines entre les cellules. Nous avons retrouvé ce miR-486-5p transporté comme cargo dans les sEVs sécrétées des CSM vers les $CD34^+$. De plus, nous montrons dans un modèle de co-incubation (sEVs avec $CD34^+$ de sujets sains), que sur le plan fonctionnel, les sEVs provenant de CSM SMD induisent plus d'apoptose, plus de stress oxydatif ainsi que plus de dommages à l'ADN.

Nous avons utilisé les propriétés du microenvironnement médullaire pour établir un modèle murin de SMD humain. En effet, la relative incapacité des cellules souches myélodysplasiques humaines de greffer et de reconstituer une hématopoïèse pathologique dans des souris immunodéprimées suggère que ces cellules souches SMD doivent avoir besoin d'un support extrinsèque du microenvironnement. Nous avons réalisé un modèle de souris humanisées en co-injectant des CSM et des $CD34^+$ en intratibial. Une prise de greffe a été observée chez toutes les souris injectées et nous avons pu étudier l'évolution clonale au fil des générations dans les différentes sous-populations de progéniteurs myéloïdes (common myeloid progenitors (CMP), granulocyte-macrophage progenitors (GMP) and megakaryocyte–erythroid progenitor (MEP)). Notre modèle est stable au cours des générations avec persistance du clone fondateur initial.

Par ailleurs, la surcharge martiale observée chez les patients SMD (souvent secondaire aux transfusions de culots globulaires) est également responsable d'un stress oxydatif. Le déférasirox (DFX), un chélaleur de fer, a montré dans le cadre d'études rétrospectives une amélioration de l'érythropoïèse chez des patients SMD. Grâce à un modèle de différenciation érythroïde avec surcharge martiale, nous avons montré que de faibles doses de DFX induisent une meilleure prolifération des progéniteurs érythroïdes (moins d'apoptose et plus de cellules en cycle) via une activation de NF-κB. Cette activation est due à une diminution du niveau de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) en rapport avec une diminution du fer labile et est contrôlée de manière très fine par le niveau de ROS.

En conclusion, ce travail confirme le rôle prépondérant du microenvironnement médullaire dans la genèse et la physiopathologie des syndromes myélodysplasiques et ouvre la voie à de nouvelles possibilités thérapeutiques.

Mots clefs : Syndrome myélodysplasique, microenvironnement, DICER1, microARN, vésicules extracellulaires, stress oxydatif, déférasirox.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) are hematopoietic stem cell (HSC) oligoclonal diseases leading to dysplasia, blood cytopenia and evolution to acute leukemia. Numerous mutations in genes involved in epigenetic regulation are responsible of MDS genesis. But recent studies show that medullar microenvironment, particularly mesenchymal stromal cells (MSC), could induce and propagate a MDS suggesting a narrow communication between HSC and this niche. DICER1 (RNAse implicating in microRNA processing) invalidation in murine osteoblastic progenitors induces a MDS with signs of dysplasia.

In this work, we have confirmed the under expression of DICER1 in MDS mesenchymal stromal cells from total bone marrow and cultured MSC. DICER1 down-regulation leads to a deregulation of miRNome profile in MDS MSC highlighted by transcriptomic approaches. We found a potential therapeutic target: miR-486-5p which is constantly overexpressed in MDS MSC. Extracellular vesicles (EVs) could be a possible way for MSC to influence HSC fates. Those EVs are heterogeneous and could be characterized by their sight. We mainly focused on small EVs (sEVs) containing the exosomal fraction known to be able to carry miRNA, mRNA and proteins. We found that miR-486-5p is carried from MSC to the HSC. Transcriptomic analyses of healthy donor (HD) HSC overexpressing miR-486-5p are ongoing. Moreover, in a co-incubation model (sEVs and HSC), sEVs coming from MDS MSC induced apoptosis, oxidative stress and DNA damages.

We have used medullar microenvironment properties to establish a murine model of MDS. Indeed, MDS HSC incapacity to reconstitute a pathological hematopoiesis in immunocompromised mice suggests that MDS HSC need an extrinsic support from the microenvironment. We have engineered a MDS patient derived xenograft (PDX) model by intra-tibial co-injection $CD34^+$ cells with MSC. All mice engrafted and we have followed the clonal evolution over mice generations in the different subsets of myeloid progenitors (common myeloid progenitors (CMP), granulocyte macrophage progenitors (GMP) and megakaryocyte–erythroid progenitor (MEP)). Our model is stable over generations with persistence of the initial founding clone.

Moreover, iron overload seen in MDS patients is also able to induce oxidative stress and DNA damages. Deferasirox (DFX), an iron chelator, has shown an erythropoiesis improvement in MDS patients. Using an erythroid differentiation model with iron overload, we have observed that low dose of DFX induce a better proliferation of erythroid progenitors (less apoptosis and more cycling cells) due to NF-κB activation. This activation is due to a decrease of reactive oxygen species level in relation to a decrease of the labile iron pool.

In conclusion, this work confirms the preponderant role of the medullary microenvironment in the genesis and physiopathology of myelodysplastic syndromes and opens the way to new therapeutic possibilities.

Key words: Myelodysplastic syndrome, microenvironment, DICER1, microRNA, extracellular vesicles, oxidative stress, Deferasirox.

"You never know what worse luck your bad luck has saved you from."
Cormac McCarthy

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **2**

RESUME **3**

ABSTRACT **4**

TABLE DES MATIERES **6**

LISTE DES FIGURES **7**

LISTE DES ABREVIATIONS **8**

INTRODUCTION **9**

1) Les syndromes myélodysplasiques **9**

a) Définition, épidémiologie, diagnostic et classification 9

b) Physiopathologie 10

c) Scores pronostiques et principes du traitement 12

2) Le microenvironnement médullaire **17**

a) Les cellules stromales mésenchymateuses et la niche endostéale 17

b) Les cellules stromales mésenchymateuses et la niche vasculaire 18

c) Les autres composants de la niche hématopoïétique 19

d) Rôle de la niche hématopoïétique dans la physiopathologie des SMD 19

3) L'interférence ARN, DICER1 et l'hématopoïèse normale ou pathologique. **22**

a) L'interférence ARN et DICER1 22

b) Rôle des miARN dans la physiopathologie des syndromes myélodysplasiques et des leucémies aiguës myéloïdes 24

4) Vésicules extracellulaires et communication intercellulaire **26**

5) Métabolisme du fer et stress oxydatif **30**

a) Généralités concernant le métabolisme du fer 30

b) Fer et stress oxydatif 32

PARTIE I : Dicer1 et miRNA : rôle du microenvironnement médullaire dans la physiopathologie des syndromes myélodysplasiques **37**

1) Introduction **37**

2) Article en cours de finalisation **37**

3) Conclusion et perspective **77**

PARTIE II : Apport du microenvironnement médullaire dans l'établissement d'un modèle murin de xénogreffe de syndromes myélodysplasiques humains **78**

1) Introduction **78**

2) Article revue de la littérature sur les modèles murins humanisés de syndrome myélodysplasique **78**

3) Article sur notre modèle de xénogreffe en cours de révision (Oncotarget) **83**

3) Conclusion et perspective **107**

PARTIE III: Rôle du stress oxydatif sur l'érythropoïèse dans les SMD **108**

1) Introduction **108**

2) Article publié (Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 62), pages : 105510-105524) **108**

3) Conclusion et perspective **132**

CONCLUSION GENERALE **133**

REFERENCES **135**

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : CRITERES DIAGNOSTIQUES DES SMD D'APRES LES CRITERES REVISES DE L'OMS (2) EN 2016. 9
FIGURE 2 : FREQUENCE DES MUTATIONS DANS LES SMD ORGANISE PAR GROUPE FONCTIONNEL D'APRES BEJAR ET AL (7). 11
FIGURE 3: EVOLUTION CLONALE AU COURS DES SMD PAR LINDSLEY (17) 12
FIGURE 4 : SCHEMA DU MICROENVIRONNEMENT MEDULLAIRE D'APRES MORRISON (54) 17
FIGURE 5 : SCHEMA DE LA BIOGENESE DES MIARN D'APRES HE (105) 23
FIGURE 6 : ORIGINE DES VESICULES EXTRACELLULAIRES D'APRES VAN NIEL ET AL. (119) 27
FIGURE 7: REGULATION SYSTEMIQUE DU FER D'APRES ANDERSON ET AL. (135) 31
FIGURE 8: FONCTIONNEMENT DU SYSTEME IRE-IRP D'APRES MILLONIG ET AL. (138) 32
FIGURE 9: PRINCIPAUX SYSTEMES ANTIOXYDANTS 33
FIGURE 10: MECANISME D'ACTION DU LUSPATERCEPT D'APRES SURAGANI (146) 107

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AREB : Anémie réfractaires avec excès de blastes

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

ASE : Agent stimulant l'érythropoïèse

CRDM : Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSL : cellule souche leucémique

CSM : cellule stromale mésenchymateuse

EPO : Erythropoïétine

GSH : Glutathion forme réduite

GSSH : Glutathion forme oxydée

GPX : Glutathion péroxydase

HMA : Agent hypométhylant

HLA : Human leukocyte antigen

IRE : Iron response element

IRP : Iron response protein

LAM : leucémie aiguë myéloïde

miARN : microARN

NTBI : Non-Transferrin Bound Iron

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

ROS : dérivés réactifs de l'oxygène

RT : Reverse Transcription

sEVs : petite vésicule extracellulaire

SMD : syndrome myélodysplasique

TRX : Thioredoxine

INTRODUCTION

1) Les syndromes myélodysplasiques

a) Définition, épidémiologie, diagnostic et classification

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) correspondent à une atteinte oligoclonale de la cellule souche hématopoïétique se traduisant par des signes de dysplasie au myélogramme, des cytopénies sanguines contrastant avec une moelle riche et une évolution vers la transformation en leucémie aiguë myéloïde dans 30% des cas. Les syndromes myélodysplasiques sont des pathologies relativement fréquentes avec une incidence globale estimée à 3/100 000 habitants par an qui augmente avec l'âge. C'est une pathologie du sujet âgé avec une moyenne d'âge au diagnostic de 70 ans affectant avec une prédominance plus forte les hommes que les femmes (4.5 vs 2.7 pour 100 000 et par an) (1).

Les critères diagnostiques actuels sont ceux de l'Organisation mondiale de la santé récemment révisés en 2016 (2) (figure 1) :

Name	Dysplastic lineages	Cytopenias*	Ring sideroblasts as % of marrow erythroid elements	BM and PB blasts	Cytogenetics by conventional karyotype analysis
MDS with single lineage dysplasia (MDS-SLD)	1	1 or 2	<15%/<5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with multilineage dysplasia (MDS-MLD)	2 or 3	1-3	<15%/<5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)					
MDS-RS with single lineage dysplasia (MDS-RS-SLD)	1	1 or 2	≥15%/≥5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS-RS with multilineage dysplasia (MDS-RS-MLD)	2 or 3	1-3	≥15%/≥5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with isolated del(5q)	1-3	1-2	None or any	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	del(5q) alone or with 1 additional abnormality except −7 or del (7q)
MDS with excess blasts (MDS-EB)					
MDS-EB-1	0-3	1-3	None or any	BM 5%-9% or PB 2%-4%, no Auer rods	Any
MDS-EB-2	0-3	1-3	None or any	BM 10%-19% or PB 5%-19% or Auer rods	Any
MDS, unclassifiable (MDS-U)					
with 1% blood blasts	1-3	1-3	None or any	BM <5%, PB = 1%,‡ no Auer rods	Any
with single lineage dysplasia and pancytopenia	1	3	None or any	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any
based on defining cytogenetic abnormality	0	1-3	<15%§	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	MDS-defining abnormality
Refractory cytopenia of childhood	1-3	1-3	None	BM <5%, PB <2%	Any

Figure 1 : Critères diagnostiques des SMD d'après les critères révisés de l'OMS (2) en 2016.

Néanmoins, les syndromes myélodysplasiques sont extrêmement hétérogènes et regroupent différentes entités diagnostiques allant de la simple cytopénie réfractaire à la leucémie myélo-monocytaire chronique associant une composante myéloprolifération, en passant par le syndrome 5q-.

b) Physiopathologie

Dans la majorité des cas, la cause des SMD est inconnue. Cependant, certains facteurs de risque ont été identifiés et correspondent à une exposition à des composés toxiques (benzène, tabagisme actif, produits phytosanitaires). D'autres causes bien identifiées à l'origine des syndromes myélodysplasiques sont les chimiothérapies ou la radiothérapie pour le traitement d'une néoplasie solide ou hématologique. Ces SMD chimio- ou radio-induits représentent 10 à 20% des SMD (3) et sont principalement dus aux anthracyclines, agents alkylants, inhibiteurs de topoisomérase et radiations ionisantes induisant un stress génotoxique (4). Les patients traités par chimiothérapie ont un risque de 1,5 de développer un SMD en comparaison à la population générale. Ce type particulier de SMD s'accompagne plus souvent d'anomalies cytogénétiques (80 à 90% contre 40 à 60% pour un SMD de novo) et sont de surcroît de mauvais pronostic avec une fréquence accrue de caryotypes complexes et d'hypoploïdie (5).

Des prédispositions génétiques ont également été identifiées et sont d'ailleurs sous-estimées au moment du diagnostic d'un SMD notamment chez un sujet jeune. Des études collaboratives et les avancées technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence de nombreuses mutations récurrentes prédisposant aux SMD et leucémie aiguë myéloïde : *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *ANKRD26*, *SRP72*, *PAX5*, *DDX4*1, *ETV6*, *ATG2B*/*GSKIP* and *TERT*/*TERC* (6).

Néanmoins, de récentes découvertes ont permis une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques responsables de la genèse des SMD. L'apport des nouvelles techniques de séquençage de l'ADN à haut débit (NGS) a permis de mettre en évidence des mutations récurrentes de certains gènes impliqués dans l'épissage alternatif, la régulation épigénétique, certains facteurs de transcription et la signalisation induite par des protéines kinases (7-9).

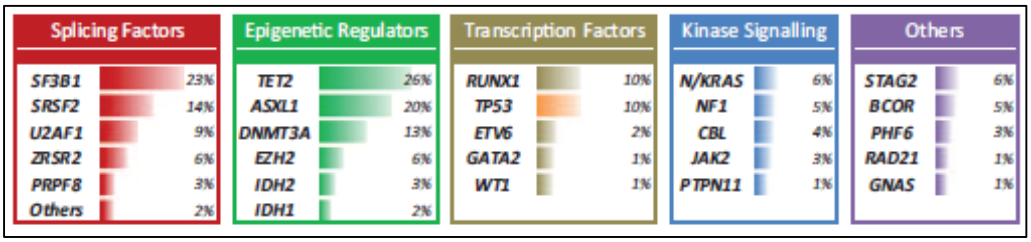


Figure 2 : Fréquence des mutations dans les SMD organisé par groupe fonctionnel d'après Bejar et al (7)

Les syndromes myélodysplasiques résulteraient d'une acquisition séquentielle de mutations au niveau des cellules souches hématopoïétiques qui vont être responsables d'une expansion clonale et d'une atteinte de la différentiation myéloïde.

En effet, des études de séquençage d'exomes ont montré l'existence d'un clone dominant dans lequel des mutations sont exprimées dans plus de 90% des cellules et coexistant avec quelques clones mineurs expliquant la pénétrance incomplète de la dysplasie au sein de la moelle dysplasique. Ces mutations ségrégent en moyenne deux clones différents dans les SMD précoces puis plus de trois clones au moment de la transformation en LAM (10). L'analyse d'échantillons séquentiels permet d'étudier les événements initiateurs (11, 12). Dans la plupart des cas, les lésions génétiques fondatrices ciblent de manière récurrente les gènes contrôlant l'épigénétique comme ceux impliqués dans la régulation de la méthylation de l'ADN (*TET2* ou *DNMT3A)* ou dans le remodelage de la chromatine *ASXL1* ou *EZH2,* et ceux intervenant dans l'épissage de l'ARN comme *SF3B1*, *SRSF2, U2AF1* or *ZRSR2* (9, 13). Les mutations de gènes contrôlant la différentiation cellulaire ou les voies de prolifération (*RUNX1*, *GATA2, BCOR*, *N/KRAS, CBL*) ou les gènes des cohésines (*STAG2*, *RAD21*) surviennent majoritairement pendant la transition du SMD à la LAM (14, 15). Ces mutations secondaires s'accumulent habituellement dans les cellules qui présentent un fond génétique constitué par des mutations présentes au début de la maladie (15, 16). En revanche, les mutations dans *NPM1*, *FLT3*, *MLL*/*KTM2A* et les réarrangements chromosomiques du core binding factor (CBF) sont généralement absents dans les SMD.

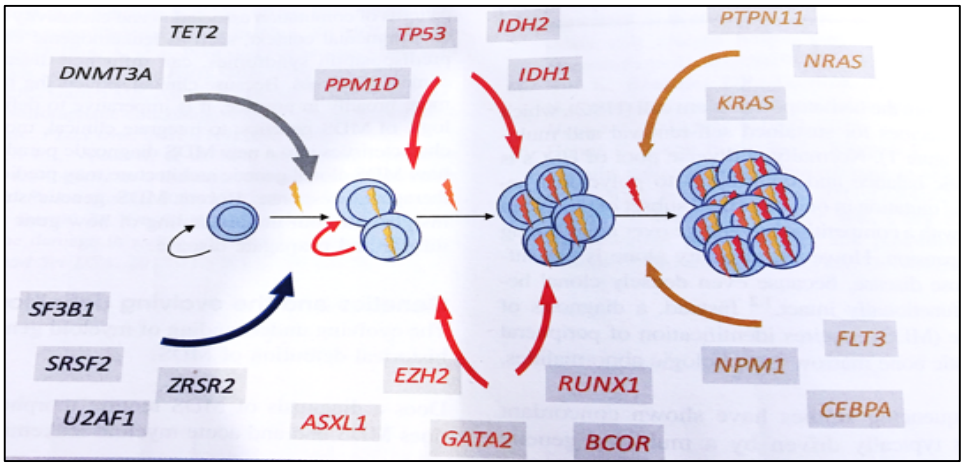


Figure 3: Evolution clonale au cours des SMD par Lindsley (17)

Durant la progression de la pathologie, le nombre de mutations, leur diversité et la taille des différents clones tendent à augmenter. Récemment, Makishima et al. (18), grâce à un suivi longitudinal de patients, ont montré que les LAM secondaires à un SMD présentent un enrichissement de mutations touchant les gènes *FLT3*, *PTPN11*, *WT1*, *IDH1, NPM1*, *IDH2* et *NRAS*. Ces mutations sont nouvellement acquises et sont associées à un mauvais pronostic. Par ailleurs, les mutations des gènes *TP53*, *GATA2*, *KRAS*, *RUNX1*, *STAG2*, *ASXL1*, et *ZRSR2* sont particulièrement présentes dans les SMD de haut risque en comparaison à ceux de bas risque avec une évolution plus fréquente vers la LAM et un pronostic plus péjoratif.

c) Scores pronostiques et principes du traitement

i) Les scores pronostiques

Les principes du traitement des syndromes myélodysplasiques dépendent du degré de sévérité de ce dernier selon les scores IPSS (19) et plus récemment le score IPSS-R (20). D'autres scores pronostiques existent comme celui de l'organisation mondiale de la santé (score WPSS, (21)) et celui du MD Anderson (MDAS, (22)) mais ils sont moins utilisés en recherche clinique.

Les SMD de bas risque définis par un score IPSS faible ou intermédiaire 1 représentent environ 2/3 des SMD. Les SMD de haut risque sont définis par un score IPSS intermédiaire 2 ou élevé. Le problème majeur des SMD de faible grade est celui du traitement des cytopénies puisque le risque de transformation en leucémie aiguë myéloïde (LAM) est assez faible (moins de 20 %) à l'inverse des SMD de haut risque.

ii) Prise en charge thérapeutique des patients de faible risque

L'anémie constitue la cytopénie la plus fréquente (plus de 80% des cas) et est fréquemment symptomatique dans les SMD de faible grade. Viennent ensuite la thrombopénie et la neutropénie qui ne représentent en général que 20% des cas. Les patients présentant une anémie non symptomatique sont généralement surveillés jusqu'à apparition de signes cliniques de mauvaise tolérance. La transfusion régulière de culots globulaires induit une surcharge martiale potentiellement pourvoyeuse de nombreuses comorbidités bien que ce retentissement soit moins bien étayé que dans d'autres populations sujettes à un niveau plus important de transfusions comme les patients thalassémiques. Généralement, les agents stimulant l'érythropoïèse (ASE) sont utilisés en première intention en France. Les ASE agissent de 2 manières au niveau de la physiopathologie des SMD : en bloquant l'apoptose importante des progéniteurs érythroïdes et en suppléant des taux d'EPO anormalement bas de certains patients. De nombreux ASE sont disponibles mais un seul d'entre eux (epoietin alpha) vient d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans les SMD. Des études randomisées indépendantes ont comparé l'efficacité de l'EPO alpha et la darbépoietine contre placebo sur la transfusion dépendance et ont montré un bénéfice en faveur des ESA (23). Le taux de réponse varie de 30 à 60% (24) et est probablement sans doute variable en raison des critères de réponse hétérogènes employés dans ces études. Une étude rétrospective du Groupe Francophone des myélodysplasies (GFM) (25) a montré une meilleure survie pour les patients traités par ASE et répondeurs par rapport aux patients recevant des transfusions uniquement. Plus récemment, deux autres études du GFM (26, 27) ont montré que le score IPSS-R, la ferritine, le taux d'EPO endogène et le nombre de mutations des gènes les plus fréquemment retrouvés dans les SMD avaient un impact sur la réponse aux ASE. Néanmoins pour les patients ayant répondu, la médiane de durée de réponse est de 2 ans et les patients qui ne répondent pas après 12 semaines d'ASE sont définis comme réfractaires ou résistants primaires. En cas de perte de réponse, il convient de vérifier l'absence de progression du SMD ou la présence d'une autre cause d'anémie surajoutée (carence martiale). Une étude du groupe suédois (28) rapporte une amélioration du taux de réponse avec l'adjonction de G-CSF dans 20 à 35 % des cas, mais il semble que ce taux soit moins élevé lorsque l'échec a été constaté après de fortes doses d'ASE, désormais recommandées en première intention (60 000 U/semaine d'EPO ou 300µg/semaine de darbépoétine) par rapport aux plus faibles doses.

En deuxième intention ou en première intention en cas de présence d'une délétion 5q (del(5q)), le lénalidomide peut être proposé. Dans les SMD de faible risque avec del(5q)

isolée, le lénalidomide est le traitement de choix. Une étude prospective (29) a montré l'obtention d'une indépendance transfusionnelle dans environ 70% des cas avec une durée médiane de réponse de plus de 2 ans. Néanmoins, cette réponse s'accompagne d'une toxicité hématologique précoce et importante (thrombopénies et neutropénies grade III-IV) qui diminue progressivement jusqu'à l'obtention de la réponse cytogénétique. Une autre étude a comparé deux doses différentes de lénalidomide (5 et 10 mg par jour) versus placebo. Il a été montré une supériorité de la dose de 10mg/j sans augmentation de l'incidence de survenue de LAM (29). Dans les SMD sans del(5q) isolés et réfractaires aux ASE, le lénalidomide permet d'obtenir une indépendance transfusionnelle chez 26% des patients avec un délai médian de réponse de 10 semaines (30). Le taux de réponse semble plus intéressant chez les patients ayant en plus un taux d'EPO<100U/L (42.5%). Une étude du GFM (31) a montré que dans les SMD réfractaires aux ASE, l'association d'un ASE avec le lénalidomide permettait d'obtenir une réponse chez 50% des patients avec une durée moyenne de réponse de 15 mois.

Pour les patients réfractaires aux thérapeutiques de 2ème ligne, de nouvelles molécules impliquées dans la signalisation du TGF-β sont en cours d'évaluation avec des résultats prometteurs. En effet, la voie du TGF- β est activée dans les syndromes myélodysplasiques aboutissant à une apoptose accrue des progéniteurs myéloïdes et érythroïdes. Le Sotatercept (ACE-011) et le Luspatercept (ACE-536) sont des molécules piégeant les ligands du récepteur du TGF- β (GDF-11 et GDF-8 notamment) bloquant ainsi son activation. Ils ont montré un effet positif sur l'érythropoïèse in vivo avec l'obtention dans 40% des cas d'une indépendance transfusionnelle et 70% d'amélioration érythroïde dans des études de phases II. Actuellement le Luspatercept fait l'objet d'une étude de phase III dans les SMD notamment dans les anémies réfractaires sidéroblastiques ayant perdu la réponse aux ASE.

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est classiquement non recommandée chez les patients atteints d'un SMD de bas risque même s'ils sont jeunes. En effets, deux études rétrospectives ont suggéré que la mortalité précoce liée à la toxicité de la procédure de greffe impactait négativement le bénéfice en termes de survie (32) et ceci même avec l'utilisation de conditionnement d'intensité réduite. Cependant, il a été montré que les patients réfractaires ou rechutant sous ASE ont une survie médiane inférieure à 5 ans (33). De plus, certains patients considérés comme bas risque sont porteurs de mutations de mauvais pronostic (ASXL1, RUNX1, EZH2, NRAS, CBL). Pour ces patients, un essai clinique prospectif du GFM destiné aux patients de risque IPSS bas ou intermédiaire et réfractaires aux ASE ou présentant des cytopénies (neutropénie ou thrombopénie) symptomatiques est en cours afin d'évaluer la place d'une allogreffe de moelle osseuse précoce (NCT clinical trial 02757989).

Pour les patients thrombopéniques qui représentent 20% des patients au diagnostic mais très peu de ces malades (moins de 5%) ont un taux inférieur à 20 G/l de plaquettes. De plus, elle peut s'accompagner d'une thrombopathie pouvant accroître le risque hémorragique. Elle répond dans 30% des cas à de fortes doses d'androgènes (Danazol 600 mg/j) (34). Néanmoins la réponse est de courte durée et l'utilisation des androgènes est limitée par les effets secondaires. Les peptidomimétiques de la thombopoïétine (TPO) vont se lier au récepteur de la TPO (c-Mpl) et l'activer. Deux de ces agents sont en cours d'évaluation dans les SMD : le romiplostim et l'eltrombopag. Le romiplostim, administré en sous-cutané, a montré son efficacité dans deux études portant sur des patients atteints de SMD de faible risque (35, 36) avec l'obtention d'une réponse chez 40 à 50% des patients dès la 3^{e}-4^{e} semaine. Le romiplostim a montré qu'il pouvait également diminuer la thrombopénie chez des patients traités par lénalidomide et par agents hypométhylants. Cependant il a été observé une augmentation du pourcentage de blastes médullaires en cours de traitement, réversible à l'arrêt de celui-ci, et sans sur-risque d'évolution vers la LAM. L'eltrombopag, utilisé par voie orale, a l'AMM dans le PTI et l'aplasie médullaire. Un essai de phase II est cours (37) et les résultats montrent un taux de réponse à 32%.

iii) Prise en charge thérapeutique des patients de risque élevé

La prise en charge des patients porteurs d'un syndrome myélodysplasique de haut risque vise à retarder l'évolution vers la leucémie aiguë myéloïde. En l'absence de traitement spécifique, la survie médiane est de 15 mois.

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques reste à ce jour le seul traitement curateur des SMD mais elle reste néanmoins possible uniquement chez des patients âgés de moins de 70 ans et possédant un donneur HLA compatible. Des études ont montré qu'il fallait réaliser précocement l'allogreffe (38). Concernant le choix du conditionnement, myélo-ablatif ou à intensité réduite, une étude très récente (39) a montré une toxicité moindre du conditionnement atténué sans différence en termes de survie globale à 2 ans faisant donc privilégier ce type de conditionnement. Néanmoins, la mortalité liée à la toxicité reste élevée de l'ordre de 30% et le taux de rechute est de 20% (40). Il est également préconisé de réduire la blastose médullaire si cette dernière est supérieure à 10% avant de réaliser la procédure de greffe (41).

En cas de contre-indication à la greffe de CSH ou l'absence de donneur HLA compatible et chez des patients âgés de moins 65 ans, la chimiothérapie intensive associant une anthracycline et un analogue de nucléoside (cytarabine) est utilisée avec des taux de réponse complète allant de 30 à 50% et n'excédant généralement pas un 1 an.

Mais le traitement qui reste actuellement le plus utilisé est les agents hypométhylants (HMA) comme l'azacitidine ou la décitabine. Ces analogues de cytosine possèdent des propriétés hypométhylantes en inhibant DNMT-1. La réexpression de certains gènes suppresseurs de tumeurs pourrait induire une apoptose, une senescence voire une différentiation cellulaire des clones pathologiques. Deux essais cliniques (42, 43) ont montré des taux de réponses globaux de 50 à 60% avec obtention d'une indépendance transfusionnelle dans 40 à 50% des cas et surtout une augmentation de la survie globale de 9 mois en comparaison du traitement conventionnel.

Pour les patients réfractaires aux thérapeutiques de 1ère ligne, de nombreuses molécules sont en cours de développement. Les inhibiteurs d'histone déacetylase (HDACi) n'ont pas montré de bénéfice clinique en monothérapie (44) mais leur association avec des HMA est en cours d'investigation dans une étude de phase II (45). De nouveaux inhibiteurs de nucléosides sont en cours de développement comme la clofarabine, un analogue de nucléoside de 2ème génération. Une étude portant sur 32 patients a montré un taux de réponse globale de l'ordre de 42% avec une survie globale moyenne de 9,2 mois (46). Des études ont montré également des résultats intéressants en associant des faibles doses de clofarabine avec de la cytarabine avec une survie globale allant de 18 à 22 mois (47, 48). Des inhibiteurs de kinases sont également en cours d'évaluation comme le Rigosertib et l'Erlotinib (un inhibiteur récepteur à l'EGF) (49, 50) et le dasatinib (51). Les inhibiteurs des immune checkpoint sont également en cours d'évaluation. Une étude a montré une surexpression de PD-1, PDL-1 et CTLA-4 dans les SMD (52). Des essais cliniques utilisant le Nivolumab ou Durvalumab en association ou non aux HMA sont en cours (53).

Cependant, le nombre de molécules disponibles pour la prise en charge des syndromes myélodysplasiques est limité. Il faut donc approfondir nos connaissances sur la physiopathologie des SMD et trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. De nombreuses études montrent une implication du microenvironnement médullaire dans la physiopathologie des SMD, qui pourrait devenir une cible thérapeutique potentielle.

2) Le microenvironnement médullaire

Que l'hématopoïèse soit normale ou anormale, elle a lieu au sein des os plats et longs au niveau de l'os spongieux. On décrit classiquement une niche endostéale au contact du tissu osseux et une niche vasculaire au contact des cellules endothéliales.

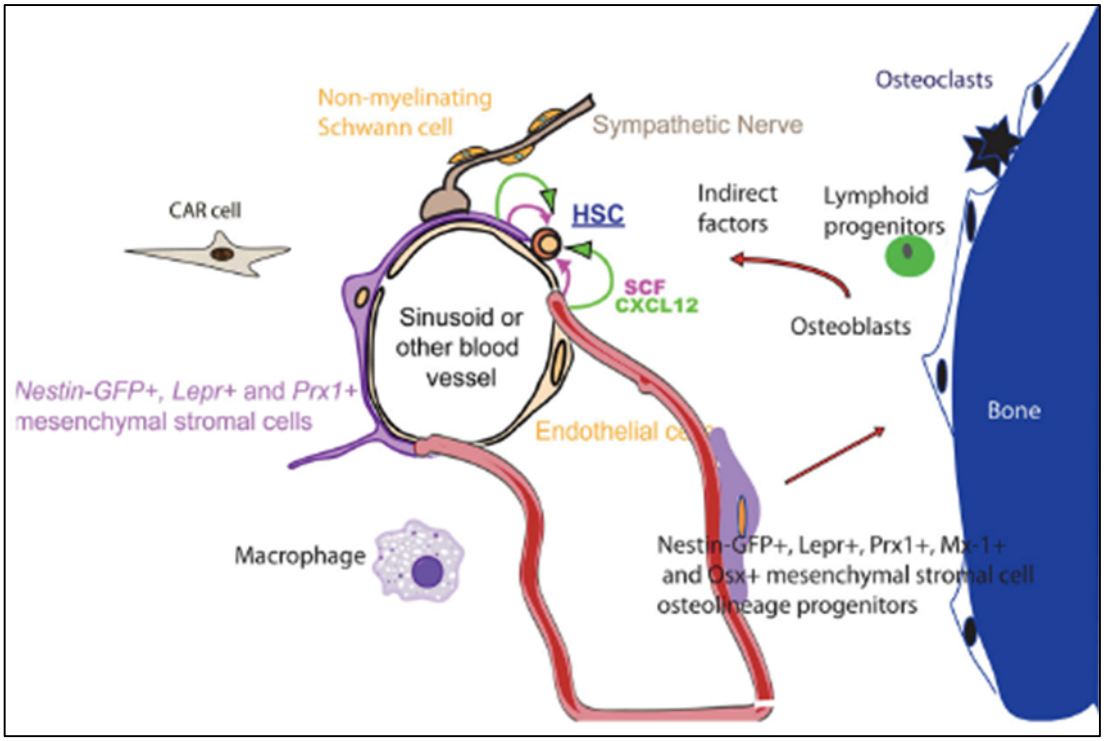


Figure 4 : Schéma du microenvironnement médullaire d'après Morrison (54)

a) Les cellules stromales mésenchymateuses et la niche endostéale

Cette notion de niche hématopoïétique a émergé dans la fin des années 1970, Schofield et al. (55) ont montré que les cellules issues de CFU-S (colony forming unit from spleen) ne reconstituaient que partiellement l'hématopoïèse dans un modèle de xénogreffe en comparaison des cellules issues directement de la moelle osseuse. Puis, il a été montré que les cellules « mésenchymateuses du stroma médullaire » pouvaient maintenir in vitro des cellules souches hématopoïétiques (56). Lord et al. (57) ont remarqué que les cellules souches hématopoïétiques étaient localisées au niveau du secteur sous endostéal au contact de l'os laissant supposer que les cellules ostéoblastiques pouvaient réguler l'hématopoïèse. En effet, les ostéoblastes sont capables de produire du Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (58) mais également du GM-CSF et de l'Interleukine 6 favorisant la conservation du caractère immature des cellules souches hématopoïétiques (59). De fait, l'ostéoblaste a été la première cellule décrite de la niche hématopoïétique comme pouvant influer sur les CSH. Les

ostéoblastes qui composent majoritairement la niche endostéale dérivent d'une même cellule, la cellule stromale mésenchymateuse (CSM).

b) Les cellules stromales mésenchymateuses et la niche vasculaire

Compte tenu de la localisation des CSH à proximité des vaisseaux sanguins, l'attention s'est portée aussi sur les cellules mésenchymateuses qui entourent les vaisseaux sanguins au niveau de la niche vasculaire. Ces cellules mésenchymateuses péri-vasculaires expriment CD146 (60), CXCL12 (61) et la Nestine (62). Il a été démontré que les cellules réticulaires CXCL12 positives (CAR cells) adjacentes aux sinusoïdes étaient co-localisées avec les CSH (61). L'ablation dans la moelle osseuse de ces cellules exprimant fortement CXCL12 induit un « épuisement » des CSH (63). Les cellules souches stromales $CD146^+$ se localisent également à proximité des sinusoïdes dans la moelle osseuse et synthétisent des niveaux élevés de cytokines spécifiques de la niche hématopoïétique comme SCF et CXCL12 (60). Par la suite, il a été démontré que les CSM de la moelle osseuse qui expriment la Nestine se localisent autour des vaisseaux sanguins en contact des CSH et que de plus, elles expriment des niveaux élevés de SCF et CXCL12 (62). Ces études démontrent que les CSM sont l'une des composantes de la niche péri-vasculaire pour les CSH et que les CSM sont omniprésentes au sein de la niche hématopoïétique et ont un rôle majeur dans la régulation de l'hématopoïèse.
Les cellules stromales péri-vasculaires et les cellules endothéliales qui synthétisent CXCL12 sont les mêmes cellules et représentent la principale source de SCF au sein de la moelle osseuse (64). Le SCF est principalement exprimé par les cellules stromales péri-vasculaires associées aux vaisseaux sanguins sinusoïdaux dans la moelle osseuse et à un niveau beaucoup plus faible par les cellules endothéliales. Le SCF n'est pas détectable dans les ostéoblastes, les mégacaryocytes ou d'autres cellules hématopoïétiques (65). Ainsi, les cellules stromales péri-vasculaires et les cellules endothéliales produisent de multiples facteurs et sont des composants cruciaux de la niche hématopoïétique.

Selon la société internationale de thérapie cellulaire (66), les cellules stromales mésenchymateuses sont définies par 3 critères :

- La capacité d'adhérer au plastique.
- L'expression du CD73, CD90 et du CD105 avec de manière concomitante l'absence d'expression du CD45, CD34, CD14 ou CD11b, du CD79α ou du CD19 et du HLA-DR.
- La capacité de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes in vitro.

c) Les autres composants de la niche hématopoïétique

D'autres cellules composent la niche hématopoïétique. Les fibres nerveuses et notamment les cellules de Schwann peuvent aussi réguler la fonction des CSH. Les fibres nerveuses ne sont pas nécessaires pour le maintien des CSH dans la moelle osseuse (67, 68) bien qu'ils soient nécessaires à la régénération de l'hématopoïèse après chimiothérapie (67). Les fibres nerveuses régulent le rythme circadien de mobilisation des CSH de la moelle osseuse probablement par la régulation cyclique de l'expression de CXCL12 par les cellules stromales (68). Par ailleurs, les cellules de Schwann non myélinisées peuvent réguler la maintenance des CSH en régulant l'activation de la voie TGF-β au sein des CSH (69).

Les macrophages médullaires font partie aussi de la niche hématopoïétique. La déplétion de la niche en macrophages induit une réduction de l'expression de CXCL12 favorisant ainsi la mobilisation des CSH (70, 71). Par ailleurs certains macrophages expriment le récepteur DARC et peuvent réguler la signalisation via l'axe TGFβ-SMAD3 au sein des CSH (72).

Les adipocytes composent aussi la niche hématopoïétique et proviennent des CSM après différenciation. Les adipocytes sont rares dans la moelle osseuse des adultes jeunes mais leur nombre augmente dramatiquement pendant le vieillissement et après myélo-ablation (73). Chez les rongeurs, la fréquence des cellules souches hématopoïétiques est plus faible dans les vertèbres de la queue, où les adipocytes sont abondants, alors qu'elles sont plus nombreuses dans les vertèbres thoraciques, où les adipocytes sont rares (73). Ces données suggèrent que les adipocytes de moelle osseuse régulent négativement la fonction des CSH. Cependant Zhou et al. (74) ont découvert que les adipocytes de la moelle osseuse synthétisent du SCF et suggèrent que l'adipogenèse est une réponse à un stress favorisant ainsi l'augmentation de l'hématopoïèse. Au-delà du SCF, les adipocytes de moelle osseuse synthétisent aussi l'adiponectine, qui favorise la régénération de l'hématopoïèse après irradiation en favorisant la prolifération de CSH (75).

d) Rôle de la niche hématopoïétique dans la physiopathologie des SMD

Pourquoi s'intéresser à l'implication des cellules stromales mésenchymateuses dans la physiopathologie des syndromes myélodysplasiques ? Il a été émis l'hypothèse que le

microenvironnement médullaire pourrait favoriser l'apoptose des cellules souches hématopoïétiques. En effet, Raza et al. (76) ont retrouvé un excès d'apoptose des cellules hématopoïétiques sur des biopsies médullaires de sujets SMD par rapport à des sujets sains ; expliquant ainsi l'hyper-cellularité médullaire contrastant avec les cytopénies périphériques. Par la suite Tauro et al. (77) ont confirmé la présence de cet excès d'apoptose en réalisant un modèle de co-cultures pendant 72h avec des CSM SMD ou témoins et une lignée cellulaire de SMD. Des études ont ensuite montré que l'excès d'apoptose des CSH observé dans les syndromes myélodysplasiques serait dû à la sécrétion de cytokines pro-apoptotiques comme le tumor necrosis factor-α (TNF-α) et Fas-ligand (Fas-L) (78) ou encore l'interféron (INF)-γ (79-82). Cette implication de l'interferon a été confirmée par des techniques de global gene profiling (81). En effet, les CSM issues de CRDM ou d'AREB présentaient une importante sur-activation de la voie de l'interféron α et β.

De nombreuses études décrivent des capacités de prolifération et de survie altérées pour les cellules stromales mésenchymateuses issues de patients SMD. Cela se caractérise surtout par une diminution du taux de prolifération, une augmentation du temps de doublement de la population et une diminution de la capacité à atteindre la confluence en culture par rapport à des CSM provenant de sujets sains (83-87). De plus, plusieurs études ont rapporté que les cellules stromales mésenchymateuses SMD ont un potentiel clonogénique réduit avec moins de formation de colonies fibroblastiques (CFU-F) in vitro (88, 89). Pavlaki et al. (90) via des données transcriptionnelles ont attribué ces capacités de prolifération diminuées des CSM SMD à une augmentation de la signalisation non-canonique de Wnt impliquée dans l'inhibition de la prolifération des cellules stromales mésenchymateuses.

Les cellules stromales mésenchymateuses de patients atteints de SMD portent des anomalies cytogénétiques différentes de celles retrouvées dans les cellules souches hématopoïétiques. Ces anomalies sont retrouvées dans 16 à 67% des cas (91, 92) alors qu'aucune anomalie cytogénétique n'a été retrouvée au sein des CSM de sujets indemnes d'hémopathie. De plus, certaines anomalies cytogénétiques présentes au sein des CSM SMD seraient spécifiques d'un sous-type de syndrome myélodysplasique (93).

Récemment, des études ont confirmé le rôle prépondérant du microenvironnement dans la genèse d'hémopathies myéloïdes. L'équipe de Kode et al (94) a montré qu'il était possible de générer une leucémie aiguë, présentant les anomalies chromosomiques spécifiques de cette pathologie, en induisant une mutation activatrice de la voie β-caténine dans des progéniteurs ostéoblastiques murins. Cette activation de la voie β-caténine était retrouvée dans 38% des ostéoblastes des patients SMD/LAM. De leur côté, Raaijmaker et al (95) ont montré qu'il

était possible d'induire un véritable syndrome myélodysplasique avec évolution vers une LAM en réalisant une délétion du gène *Dicer1* dans des progéniteurs ostéoblastiques murins. DICER1 est une protéine intervenant dans la physiologie de l'interférence ARN.

3) L'interférence ARN, DICER1 et l'hématopoïèse normale ou pathologique.

a) L'interférence ARN et DICER1

L'interférence ARN correspond à un mode de régulation post-transcriptionnelle. Ces petits ARN non codants ont été découverts par l'équipe de Kennedy (96) dans les années 1970 mais ne seront véritablement étudiés que dans les années 1990 (97) et c'est en 2001 (98) que va apparaître la dénomination « micro ARN » ou miARN ou bien miR désignant un sous-groupe d'ARN interférents. Il s'agit de courtes séquences d'acides nucléiques de 20 à 30 nucléotides monocaténaires et produites de manière endogène par la cellule qui vont se fixer à leur ARNm cibles pour les dégrader ou inhiber leur traduction. Ils représentent 2% des ARN totaux. L'ensemble des miARN est référencé sur une base de données nommée miRBase (http://www.mirbase.org/). Elle recense actuellement 28645 microARN humains matures dans sa 21ème version mise à jour en Juillet 2014. Il existe également des bases de données permettant de relier un miARN à des cibles. La base de données microT-CDS utilise un algorithme pour prédire des cibles théoriques du miRNA basé sur la compatibilité des régions 3'-UTR et CDS (http://www.microrna.gr/microT-CDS). Target Scan est une base de données reposant sur des données validées de façon expérimentale (microarrays et protéomique) et décrit plus de 65 000 interactions miARN-gène (http://www.microrna.gr/tarbase). Récemment, un nouvel outil a été créé : miRCarta (https://mircarta.cs.uni-saarland.de/) permet de recouper toutes ces bases de données et apporte une aide précieuse dans l'investigation de ces miARN (99).

La grande majorité des (80%) des miARN sont issus de régions introniques. Les gènes des miARN sont d'abord exprimés sous forme de long précurseur par une polymérase II ou III. Ce précurseur appelé pri-microARN (100) possède une queue polyA participant à sa stabilité (101). Ensuite ce pri-microARN va être pris en charge au niveau du noyau par un complexe protéique composé par l'enzyme Drosha (endonucléase) et de son cofacteur la protéine DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8). Ce complexe protéique va cliver le pri-microARN et générer un ARN de 60 à 100 nucléotides ayant une structure en épingle à cheveux : le pré-microARN (102). Ce dernier sera exporté hors du noyau vers le cytoplasme par l'exportine 5. Dans le cytoplasme, le pré-microARN sera pris en charge par une ribonucléase de (type III) DICER1 qui va cliver la structure en épingle à cheveux et générer un ARN double brin de 21 à 23 nucléotides. DICER1 est une protéine de 220 kDa qui

comprend plusieurs domaines fonctionnels : un domaine hélicase, un domaine DUF283 (domain of unknown function, un domaine PAZ (Piwi-argonaute-Zwille), 2 domaines RNAse et un domaine de liaison aux ARN double brins (103). Par la suite, DICER1 va s'associer à d'autres protéines notamment celle de la famille des Argonautes (Ago1 ou Ago2) et TRBP (trans-activation response RNA binding protein) pour former le complexe RISC (RNA-induced Silencing Complex) qui va prendre en charge l'ARN double brin. Une hélicase va séparer les deux brins d'ARN et ne garder qu'un seul des 2 qui sera appelé le miARN mature (104).

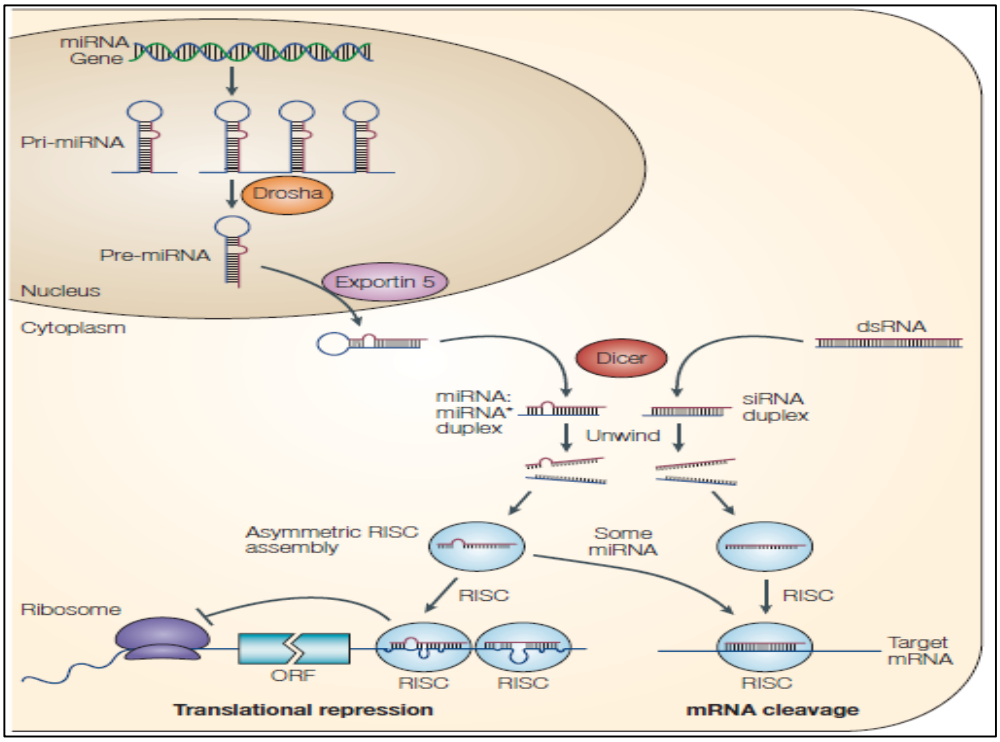


Figure 5 : Schéma de la biogénèse des miARN d'après He (105)

Un ARNm cible va être incorporé au sein de la machinerie RISC permettant l'interaction du miARN et l'ARNm. En fonction de la complémentarité plus ou moins grande entre l'ARNm et le miARN, soit l'ARNm sera dégradé, soit il y aura inhibition de la traduction (105) aboutissant à une régulation post-transcriptionnelle. L'interaction du miARN et de l'ARNm messager cible a lieu respectivement au niveau 5'UTR et 3'UTR. Cependant la liaison entre le miARN et l'ARNm n'a pas besoin d'être parfaite. Cette liaison est dominée par la « seed region » du miARN mature, qui comprend 8 nucléotides. Divers facteurs peuvent augmenter cette liaison comme des paires de bases supplémentaires vers l'extrémité

3’UTR de la séquence du miRNA mature, le nombre total de sites de liaison d'un miARN au 3 'UTR de l’ARNm cible ou encore un enrichissement local en U et A (106).

Bien que les miARN ont une implication majeure dans la physiologie normale de la cellule, on comprend aisément que de par leur propriété de régulation post-transcriptionnelle, ils peuvent influer l’expression de gènes et que leur expression aberrante puisse engendrer des processus néoplasiques.

b) Rôle des miARN dans la physiopathologie des syndromes myélodysplasiques et des leucémies aiguës myéloïdes

Beaucoup de néoplasies humaines dont notamment les SMD et leucémies aiguës sont caractérisées par une réduction globale de l’expression de miARN (107). Cependant certains miARN peuvent agir comme des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs. L’implication des miARN dans la physiopathologie des SMD ainsi que leur rôle dans la résistance aux thérapeutiques actuelles sont en cours d’investigation par de nombreuses équipes.

Plusieurs études récentes ont démontré une expression aberrante de miARN chez des patients atteints de SMD utilisant des techniques de micro-array. Sokol et al. (108) ont examiné le niveau global d’expression des miARN à partir de cellules mononuclées provenant de 44 patients SMD et 17 donneurs sains et ont observé des niveaux élevés de miR-222, miR-10a et de faibles niveaux de miR-146a, miR-150 et Let-7e dans les SMD. De plus, des profils d'expression de miARN distincts ont été observés dans des cellules $CD34^+$ provenant de patients SMD type 5q- avec une surexpression du miR-34a et une régulation négative de miR-146a (109). Vasilatou et al. (110) ont évalué les profils d'expression de let-7a, miR-17-5p et miR-20a dans des cellules $CD34^+$ provenant de la moelle osseuse de 43 patients SMD et du sang périphérique de 18 donneurs sains, et ont trouvé que ces miARN étaient surexprimés dans les SMD à faible risque mais sous-exprimés chez les patients SMD haut risque. Thol et al. (111) ont analysé les mutations du miR-142 et des miR associés (miR-632 et miR-891), dans une grande cohorte de 935 patients atteints de LAM ou de SMD. Le miR-142 est muté de façon récurrente mais peu fréquente dans les SMD de novo et dans les LAM secondaires à un SMD. Les mutations dans miR-632 et miR-891 sont encore plus rares. Les mutations de ces micro-ARN surviennent avec des mutations de IDH, et sont associées à un caryotype normal mais à une faible survie.

Cependant, il y a très peu de miARN qui se recoupent parmi toutes ces études, ce qui peut refléter l'hétérogénéité de la maladie mais peut aussi être dû à des variations entre les protocoles de traitement de l'échantillon et de détection des miARN. Il y a de plus en plus de preuves que des miARN sont exprimés de manière aberrante chez les patients atteints de SMD et sont soit des oncomiR soit des miR suppresseurs de tumeur. Leur implication dans le développement des SMD sont en cours d'investigation. Il a été montré que la surexpression de miR-22 dans le compartiment hématopoïétique entraîne une réduction des taux globaux de 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC) et, inversement, une augmentation des taux de 5-méthylcytosine (5-mC), suggérant que miR-22 a un rôle dans la régulation épigénétique (112).

Par ailleurs, certains miR ont été décrits comme pouvant prédire la résistance à certaines thérapeutiques et de fait avoir une valeur pronostique. Solly et al. (113) ont comparé l'expression de 754 miARN dans des cellules de syndromes myélodysplasiques de haut risque résistants ou sensibles à l'azacitidine. Sept miARN, dont 5 in silico ciblant le 3'UTR de DNMT1, sont réprimés dans des cellules résistantes à l'azacitidine et corrélés à des taux plus élevés de DNMT1. L'inhibition spécifique des miARN endogènes anti-DNMT1 augmente l'expression de DNMT1 induisant ainsi la résistance à l'azacitidine. Les patients porteurs d'un taux faible de miR-126 présentaient des taux de réponse significativement plus faibles et des taux de rechute plus élevés ainsi qu'une survie plus courte sans progression après traitement par azacitidine.

Néanmoins bien que les profils d'expression aberrante des miARN et leurs potentiels oncogéniques sont relativement bien décrits dans les cellules hématopoïétiques de patients atteints par un SMD, il existe très peu de données concernant la dérégulation des profils de miARN au sein des constituants de la niche hématopoïétique au cours des SMD.

Par ailleurs, les vésicules extracellulaires, notamment les exosomes, ont été décrites comme pouvant transporter des miARN et impliquées dans la communication intercellulaire.

4) Vésicules extracellulaires et communication intercellulaire

La communication intercellulaire est essentielle pour les organismes multicellulaires car elle est indispensable pour de nombreux processus physiologiques. La communication intercellulaire peut être assurée par des facteurs solubles (signalisation paracrine et endocrine) et par des contacts de cellule à cellule médiée par les synapses (neurologiques et immunologiques), ou encore les gap-jonctions.

D'autres modes de communication intercellulaire existent comme les vésicules extracellulaires. Toutes les cellules sont capables de sécréter divers types de vésicules membranaires, connus sous le nom de vésicules extracellulaires. La sécrétion de vésicules extracellulaires a été initialement décrite comme un moyen d'éliminer les composés inutiles de la cellule (114). Cependant, les vésicules extracellulaires sont plus que de simples transporteurs de déchets. Elles permettent l'échange de différents composants entre les cellules (acides nucléiques, lipides et protéines) et jouent un rôle de signalisation dans les processus homéostatiques cellulaires normaux ou en conséquence à des développements pathologiques (115, 116). Même si le terme générique de vésicules extracellulaires est actuellement utilisé pour se référer à toutes ces vésicules sécrétées, elles sont cependant très hétérogènes. Basé sur les connaissances actuelles de leur biogenèse, les vésicules extracellulaires peuvent être divisées en deux grandes catégories: exosomes et microvésicules. Les exosomes sont des vésicules formées par le bourgeonnement intérieur de la membrane endosomale pendant la maturation du corps multivésiculaire (MVE) et sécrétées par la fusion du MVE avec la surface cellulaire (117). Leurs tailles varient de 50 à 150 nm de diamètre. Les microvésicules sont générées par le bourgeonnement extérieur et la fission de la membrane plasmique aboutissant à la libération ultérieure de vésicules dans l'espace extracellulaire (118). Leurs tailles varient de 50 nm à 1000 nm de diamètre, mais elles peuvent être de taille plus importante comme dans le cas des oncosomes.

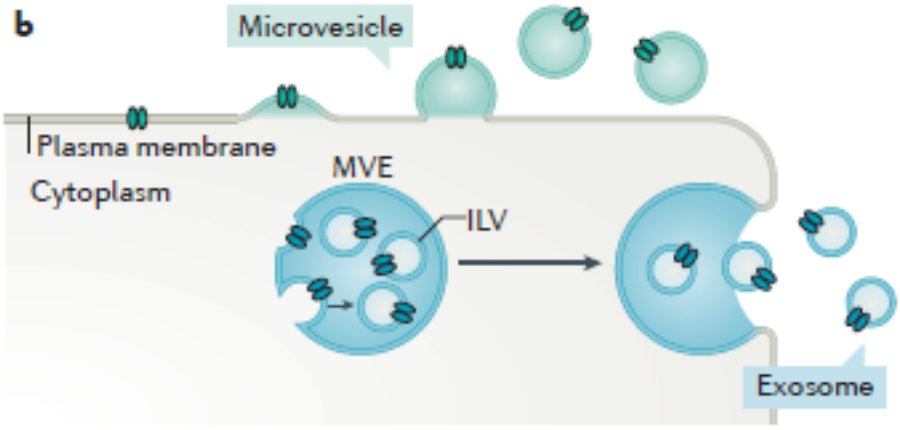


Figure 6 : Origine des vésicules extracellulaires d'après van Niel et al. (119)

Néanmoins, il n'existe pas actuellement de consensus pour la nomenclature des vésicules extracellulaires. L'ultracentrifugation différentielle est la technique la plus largement utilisée pour séparer et collecter des vésicules sécrétées. On peut définir les différentes vésicules en fonction de la vitesse de centrifugation utilisée : les microvésicules correspondent au culot obtenu à 10 000g et les exosomes celui obtenu à 100 000g (120). Par ailleurs, les exosomes étaient classiquement décrits comme ayant une morphologie en forme de coupe et d'une taille de 50 à 100nm en microscopie électronique (114). Néanmoins cet aspect caractéristique a été démontré comme étant dû à un artéfact expérimental (121).

Récemment Kowal et al. (122) ont réalisé un analyse protéomique des différentes fractions obtenues lors des étapes de centrifugation différentielle. Ils proposent une catégorisation des vésicules extracellulaires (EVs), qui pourrait être appliquée à toutes les sources de vésicules extracellulaires (cellules cultivées ou fluides biologiques) :

- Les EVs de grande taille obtenues par centrifugation à faible vitesse (2000g),
- Les EVs de taille moyenne obtenues par centrifugation à moyenne vitesse (10 000g),
- Les petites EVs (sEVs) obtenues par centrifugation à haute vitesse de rotation (100 000g).

Parmi les sEVs, quatre sous-catégories peuvent être définies en fonction des marqueurs protéiques :

- Les sEVs enrichies en tétraspanines (CD63, CD9 et CD81) qui représentent la fraction exosomale provenant des endosomes ;
- Les sEVs dépourvues de CD63 et de CD81 mais enrichies en CD9 (correspondant à des sEVs avec un début de signature endosomale) ;

- Les sEVs dépourvues de CD63 / CD9 / CD81 ;
- Les sEVs enrichies en protéine de la matrice extracellulaire ou en facteurs dérivés du sérum, ces deux dernières catégories n'étant pas associées à la voie endosomale.

L'implication des vésicules extracellulaires dans la physiopathologie des hémopathies a déjà été décrite. De manière intéressante, Horiguchi et al. (123) ont montré que les cellules souches leucémiques (CSL) issues de patients LAM sécrétaient des vésicules extracellulaires qui étaient incorporées dans les cellules stromales mésenchymateuses. Ces CSM présentaient des capacités de soutien moindre des CSH dû à une expression aberrante de facteurs de croissance hématopoïétiques tels que JAG1, SCF et ANGPT1. L'inhibition de la sécrétion des vésicules extracellulaires par les CSL restaure partiellement l'expression de ces facteurs de croissance par les CSM. De plus, ces vésicules sont enrichies en miR-7977. La surexpression du miR-7977 dans les CSM diminue leurs capacités de support. Cependant, il y a très peu d'études s'intéressant au contenu et à l'implication des vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules stromales dans les SMD et les LAM.

Un autre mode de communication intercellulaire peut contribuer à la physiopathologie des SMD et des LAM, il s'agit des nanotubes (TNT). Les projections cellulaires représentent un mode de communication qui est utilisé par divers types cellulaires et comprennent dendrites, filopodes et les nanotubes. Les nanotubes sont des extensions cytoplasmiques transitoires à base d'actine étirées entre 2 cellules sous la forme de canaux nanotubulaires découverts par Rustom et al. (124). Ce sont des canaux avec des extrémités ouvertes qui relient directement le cytoplasme de deux ou plusieurs cellules. Les TNT peuvent transporter des protéines, lipides, des ions, des ARN dont des miARN et des organelles de façon bidirectionnelle (124, 125). Comme les EVs, les TNT comprennent des sous-types et des structures morphologiques hétérogènes. Deux classes de TNT peuvent être définies par leur architecture cytosquelettique, leur taille et leurs propriétés fonctionnelles. Les TNT de type 1 sont plus longs et plus grands que le type 2 (126, 127). De plus, les TNT de type 1 contiennent des microfilaments et des microtubules, tandis que la tubuline est absente des TNT de type 2. En conséquence, le trafic d'organelles n'est observé que pour les TNT de type 1. En effet, il a été montré qu'il existait un transfert de mitochondries du microenvironnement vers les cellules leucémiques leur conférant ainsi un avantage en termes de survie et une protection accrue envers les chimiothérapies (128, 129).

Néanmoins, le microenvironnement médullaire n'est pas le seul facteur extérieur à la cellule souche hématopoïétique impliqué dans la physiopathologie des SMD. En effet, le

stress oxydatif généré par la surcharge martiale peut aussi être à l'origine d'un stress génotoxique, sujet que nous allons développer dans le chapitre suivant.

5) Métabolisme du fer et stress oxydatif

a) Généralités concernant le métabolisme du fer

Le fer est un cation indispensable au fonctionnement cellulaire. En effet, il intervient dans le transport d'oxygène, la synthèse de l'ADN et permet de catalyser des réactions de transfert d'électrons. Les réserves normales de fer sont de 25 à 45mg/kg chez l'homme. La grande majorité du fer est incorporée dans l'hème de l'hémoglobine et le reste dans la myoglobine et les différents cytochromes. Les principaux sites de stockages et de recyclage du fer sont le foie ainsi que les macrophages du tissu réticuloendothélial. Physiologiquement, une faible quantité de fer est éliminée par la sudation, la desquamation cutanée et du tractus digestif et par les menstruations chez la femme. Ces pertes sont compensées par l'absorption intestinale de fer héminique et non héminique. Le fer ferrique (Fe^{3+}) est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) au niveau de la bordure en brosse des entérocytes par la protéine DcytB (Duodenal cytochrome B) avant de pénétrer dans l'entérocyte via un transporteur nommé DMT1 (130). Le fer va traverser l'entérocyte et, avant de gagner la circulation grâce à la ferroportine (FPN), il subira une oxydation par 2 protéines à activité ferroxydase. Une fois dans la circulation, le fer sera lié à la transferrine et pourra être assimilé par les cellules de l'organisme via le récepteur TFR1. Ce récepteur possède une forte affinité pour le complexe fer-transferrine et va pénétrer dans la cellule par endocytose. Dans les cellules, le fer non utilisé sera stocké sous forme non réactive par la ferritine.

L'homéostasie systémique du fer est régulée par l'hepcidine (Figure 6). Ce petit peptide de 25 acides aminés est sécrété de façon majoritaire par les hépatocytes. La cible principale de l'hepcidine est la FPN qui agit comme le récepteur de l'hepcidine. Le complexe hepcidine-FPN est ubiquitinilé, internalisé et dégradé avec comme conséquence une diminution du fer circulant plasmatique (131). Ainsi, lorsque la concentration plasmatique de fer est élevée, la concentration d'hepcidine est élevée et l'approvisionnement en fer via le plasma est réduit ; cependant, lorsque les demandes en fer sont élevées, la concentration d'hepcidine est réduite, et plus de fer entre dans la circulation. Les principales cellules exportatrices de fer comprennent les macrophages qui recyclent le fer dérivé de l'hème des globules rouges sénescents, les hépatocytes qui sont le principal site de stockage de fer et les entérocytes qui facilitent l'apport alimentaire en fer (132). Néanmoins, la plupart des cellules sont capables d'exporter du fer à travers FPN et ainsi sont des cibles potentielles d'hepcidine. La synthèse d'hepcidine peut être régulée par divers stimuli. Certains sont directement liés au métabolisme du fer, tels que l'augmentation du fer fixé sur la transferrine sérique ou de la

quantité de fer intracellulaire, ou relèvent d'autres mécanismes, comme l'activation de la voie médiée par l'IL-6, produit de l'inflammation (133, 134).

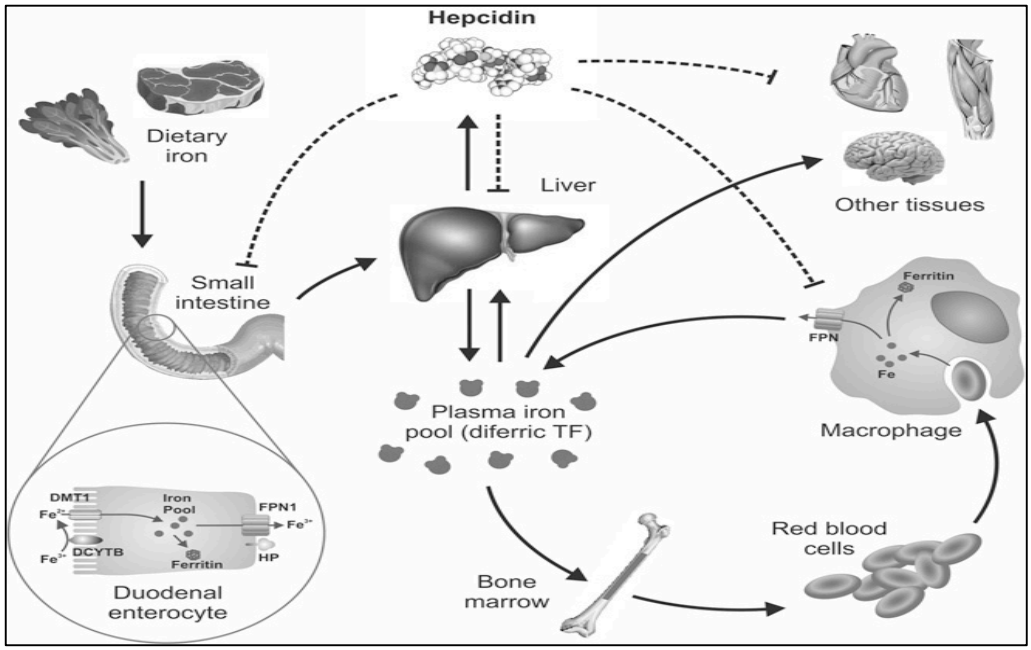


Figure 7: Régulation systémique du fer d'après Anderson et al. (135)

L'homéostasie du fer intracellulaire est assurée et contrôlée par le système IRE-IRP (Iron Response Element-Iron Response Protein) (Figure 7). Il existe 2 isoformes d'IRP : IRP1 et IRP2. IRP1 est cytoplasmique et IRP2 mitochondriale. IRP1 a une activité qui varie selon la concentration de fer intracellulaire. Quand la concentration de fer est normale, IRP1 possède un centre fer-soufre au niveau de son site catalytique lui conférant une activité aconitase. Cependant, quand la quantité de fer diminue, IRP1 perd son centre fer-soufre et subit un changement de conformation et agit comme un facteur de transcription. IRP2 est différente dans son mode de régulation. En effet, elle ne possède pas de centre fer-soufre et elle est rapidement dégradée par le protéasome en cas d'excès de fer. Les IRP vont interagir au niveau des motifs IRE qui sont des motifs type épingle à cheveux et situés soit en 3'ou en 5'-UTR d'ARNm de gènes impliqués dans le métabolisme du fer. En 3'-UTR, les IRP stabilisent les ARNm notamment celui de TRF1. Par contre, elles empêchent la traduction des ARNm portant le motif IRE en 5'-UTR. D'autres gènes sont régulés de cette manière par le système IRP-IRE comme DMT1, FPN, la 5-aminolevulinic acide synthase 2 et HIF 2a (136). De fait, le système IRE-IRP et surtout l'activité IRP représentent un bon moyen de mesurer la quantité de fer fonctionnel intracellulaire (137).

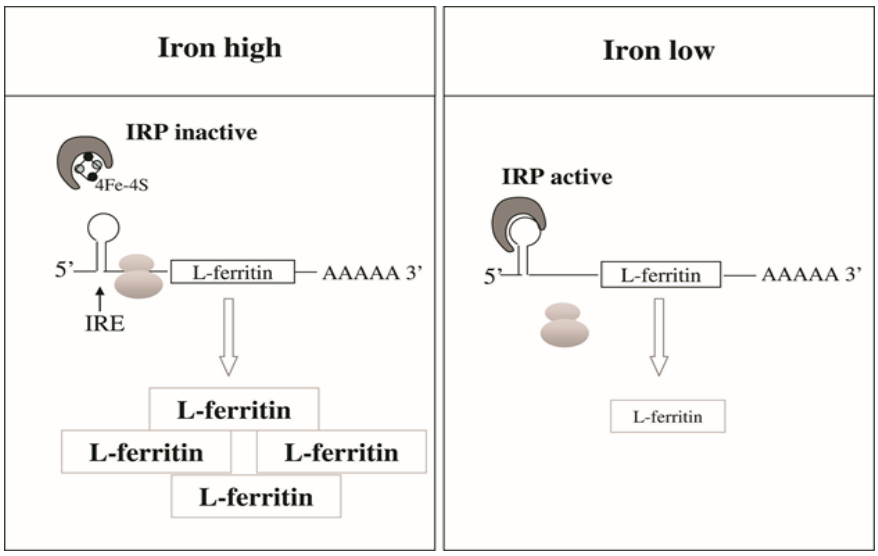


Figure 8: Fonctionnement du système IRE-IRP d'après Millonig et al. (138)

Cependant, il n'existe aucun mécanisme efficace d'excrétion du fer si bien que tout apport exogène de fer ou toute perturbation endogène du métabolisme du fer induit une accumulation de fer toxique dans les tissus.

b) Fer et stress oxydatif

En effet, quand les capacités de fixation de la transferrine sont dépassées (>70% de saturation), du fer non lié à la transferrine apparaît (NTBI). Le fer libre par son activité redox peut produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) notamment le radical hydroxyle via la réaction de Fenton : $Fe^{2+} + H_2O_2 = Fe^{3+} + OH^- + {}^{\cdot}OH$. Ce radical est hautement réactif et peut générer un stress oxydatif majeur délétère pour le fonctionnement cellulaire.

En conditions physiologiques, les défenses enzymatiques et non-enzymatiques inhibent l'attaque oxydante. Les défenses enzymatiques possèdent toutes un métal de transition capable de prendre différentes valences pour transférer les électrons pendant le processus de détoxification. La superoxyde dismutase possèdent deux isoformes (Figure 8). La forme manganèse est restreinte aux mitochondries et la forme cuivre-zinc se trouve dans le cytosol. Elles convertissent l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène est ensuite décomposé en molécule d'eau par les actions de la catalase ou de la glutathion peroxydase. L'activité de la glutathion peroxydase dépend de la présence de glutathion réduit (GSH) en tant que donneur d'hydrogène. Le glutathion est le principal tampon redox intracellulaire possédant des groupements thiol. Il est synthétisé dans le cytosol et participe à un grand nombre de réactions anti-oxydantes en formant du GSSH qui sera

reconverti en GSH par l'action de la glutathion réductase grâce au NADPH. Ce dernier est généré par la voie des pentoses phosphates. Il existe un autre système enzymatique utilisant les groupements thiols. Il s'agit des thiorédoxines (TRX) capables de neutraliser le peroxyde d'hydrogène, mais à leur tour, elles nécessiteront une réduction par la thiorédoxine réductase (139). Il existe deux isoformes de thiorédoxine : TRX 1 est cytosolique et TRX 2 est mitochondriale. Les défenses non enzymatiques comprennent l'ascorbate (vitamine C) et l'α-tocophérol (vitamine E). La céruloplasmine et la transferrine jouent également un rôle important en séquestrant le fer libre en inhibant ainsi la réaction de Fenton et la production de radical hydroxyle.

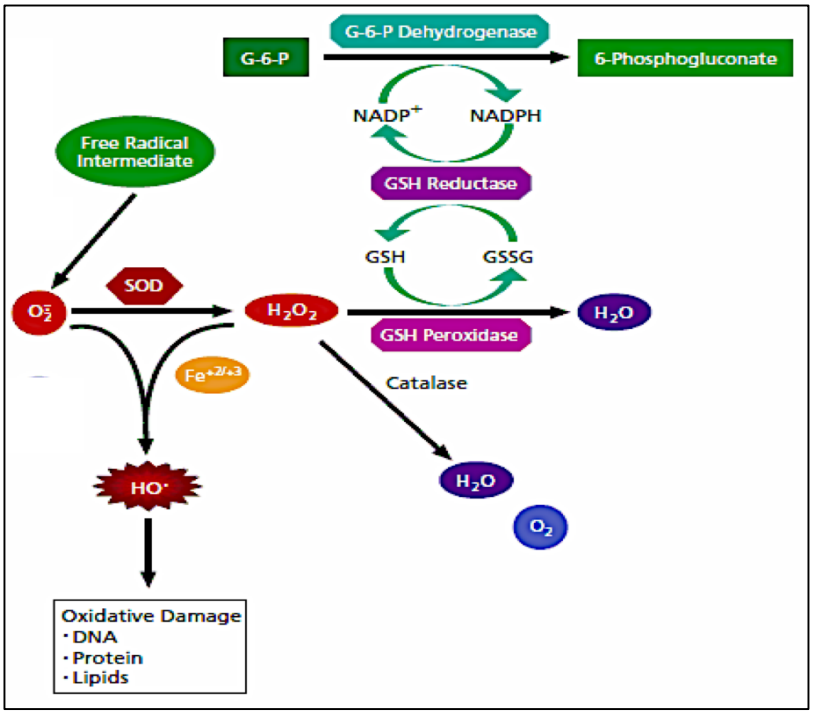


Figure 9: Principaux systèmes antioxydants

Cependant quand les capacités de chélation des systèmes antioxydants sont dépassées, les ROS en excès vont être délétères pour le métabolisme cellulaire. En effet, les radicaux hydroxyles sont capables de provoquer une peroxydation lipidique dans la membrane plasmique ou celle de n'importe quelle organelle qui contient de grandes quantités de chaînes latérales d'acides gras polyinsaturés. En extrayant l'hydrogène de la chaîne latérale hydrocarbonée d'un acide gras, ils créent un radical centré sur le carbone. Si de l'oxygène est présent, il peut réagir pour former un radical peroxyl (-C-O-O), qui à son tour est capable d'extraire l'hydrogène d'un acide gras adjacent, propageant ainsi la réaction. Cette peroxydation lipidique va perturber le fonctionnement et la signalisation membranaire.

Les acides aminés protéiques sont également une cible pour les ROS. L'oxydation directe des chaînes latérales conduit à la formation de groupes carbonyles (140) aboutissant à des dysfonctions protéiques.

L'ADN est attaqué principalement par les radicaux hydroxyles soit au niveau des bases soit sur le désoxyribose (141). Le radical hydroxyle peut réagir avec la guanine pour produire la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine, espèce mesurable biochimiquement et en immuno-histochimie. Les attaques sur le désoxyribose peuvent provoquer des ruptures de brins, tandis que celles sur les histones peuvent entraîner des réticulations qui interfèrent avec le repliement de la chromatine, la réparation de l'ADN et la transcription. Ces attaques peuvent aboutir à des mutations géniques ou à une expression génique aberrante.

Récemment, une mort cellulaire liée à un excès de fer a été décrite. Le terme ferroptose a été inventé en 2012 (142) pour décrire la forme de mort cellulaire induite par l'érastine, qui inhibe l'importation de cystine intracellulaire, entraînant une déplétion en glutathion et une inactivation de la protéine GPX4 (143). GPX4 convertit des hydro-peroxydes lipidiques potentiellement toxiques (L-OOH) en alcools lipidiques non toxiques (L-OH). L'inhibition de GPX4 par déplétion de GSH avec de l'érastine, ou avec l'inhibiteur direct de GPX4 aboutit à une peroxydation lipidique importante qui entraîne la mort cellulaire. Or, la principale cause de peroxydation lipidique est le radical hydroxyle produit par la réaction de Fenton. La ferroptose décrit une forme de mort cellulaire régulée qui survient à la suite d'une peroxydation lipidique létale. La mort cellulaire survenant exclusivement par ferroptose peut être inhibée par des chélateurs du fer, des antioxydants lipophiles, des inhibiteurs de la peroxydation lipidique et une déplétion des acides gras polyinsaturés et est corrélée à l'accumulation de marqueurs de la peroxydation lipidique.

Dans ce travail de thèse, nous souhaitons confirmer que la niche hématopoïétique ainsi que l'environnement médullaire sont les éléments moteurs de la physiopathogenèse des syndromes myélodysplasiques et pourraient participer à l'émergence des clones pathologiques au sein des cellules souches hématopoïétiques.

Nous avons utilisé deux stratégies pour étudier ce rôle pathologique de la niche hématopoïétique dans les SMD :

- Une démarche in vitro en partant de modèles de co-culture de type LTC à partir de prélèvements primaires de patients ;
- Une démarche in vivo en mettant au point un modèle murin humanisé de SMD en impliquant le microenvironnement médullaire c'est-à-dire les CSM.

Dans un premier temps, nous avons démontré et confirmé que le stroma médullaire provenant de patients SMD possède des capacités de support moindre vis-à-vis des cellules souches hématopoïétiques (moins de prolifération et de survie des CSH). Ensuite, nous avons voulu mieux caractériser les anomalies fonctionnelles du stroma médullaire SMD expliquant le phénotype particulier observé. La seule étude actuellement montrant une anomalie fonctionnelle des CSM responsable de la genèse des SMD est celle du modèle murin de Raajmakers. Nous avons voulu vérifier si l'hypothèse de la sous expression de DICER1 dans cellules stromales mésenchymateuses humaines issues de patients SMD était vérifiée, et par conséquent responsable d'une dérégulation du profil miARN au sein des cellules stromales mésenchymateuses SMD. Nous avons mis en évidence un pattern spécifique de dérégulation de miARN dans ces cellules stromales mésenchymateuses SMD. Ensuite comme les miARN ont été décrits comme pouvant être véhiculés par les vésicules extracellulaires (moyens de communication intercellulaire), nous avons étudié la communication entre les cellules stromales mésenchymateuses et les cellules souches hématopoïétiques via les petites vésicules extracellulaires et leur contenu en miARN. Nous montrons que ces sEVs issus des stromas SMD induisent une perturbation phénotypique des CSH et notamment des dommages à l'ADN induits par le stress oxydatif. Enfin, nous avons étudié en détail le rôle du stress oxydatif induit par la surcharge martiale sur l'érythropoïèse dans les SMD et montrons qu'en régulant finement le niveau de ROS via un chélateur de fer, il est possible de moduler la prolifération des progéniteurs érythroïdes issus de patients SMD par la voie NFKB.

Donc nous présenterons ce travail de thèse sous forme de 4 articles :

- 1) Dicer1 et miARN, rôle du microenvironnement médullaire de la physiopathologie des syndromes myélodysplasiques,
- 2) Une revue de la littérature sur les modèles murins de SMD,

- 3) Notre modèle murin de xénogreffe SMD,
- 4) Rôle du stress oxydatif sur l'érythropoïèse dans les SMD.

ORIGINAL PAPER

DICER1 deregulates the miRNome of the bone marrow niche of low risk myelodysplastic syndromes

Mathieu Meunier [1, 2], Natacha Mauz [1,2], Sarah Ancelet[2], Audrey Guttin[3], Jean-Paul Issartel[3], David Laurin[2], Christine Lefebvre[4], Virginie Persoons[5], Mylène Pezet[6], Karin Pernet-Gallay[7], Florent Chuffart[2], Sophie Rousseaux[2], Julien Thevenon[8], Karine Laulagnier[3], Rémy Sadoul[3], Christine Chatelard[3], Pierre Hainaut[2], Benoît Polack[1], Jean-Yves Cahn[1], Sophie Park[1, 2]

[1] University Clinic of hematology, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France.
[2]CNRS UMR 5309, INSERM, U1209, Université Grenoble Alpes, Institut Albert Bonniot, 38700 Grenoble, France.
[3] Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U836, Grenoble Alpes University, Grenoble, France.
[4] Laboratoire de Génétique Onco-Hématologique, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France.
[5] Unité Mixte de Thérapie Cellulaire EFS RA, UM biochimie des cancers et Biothérapies, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France.
[6] Plateforme de Microscopie Photonique - Cytométrie en Flux, Institut Albert Bonniot, 38700 Grenoble, France.
[7] Grenoble Institut des Neurosciences, Plateforme de Microscopie électronique, Grenoble Alpes University, Grenoble, France.
[8] Département de Génétique et Procréation, CHU Grenoble Alpes, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France.

Contact information for correspondence:

Meunier Mathieu and Sophie Park

Clinique Universitaire d'Hématologie, CHU Grenoble Alpes

CS10217, 38043 Grenoble cedex 09 France

Tel: (33) 04 76 76 75 75 ; Fax: (33) 04 76 76 56 61

Email: mmeunier2@chu-grenoble.fr or spark@chu-grenoble.fr

Presented in part at the 35st France Society of Hematology Annual Meeting, April 1-3 2015, Paris and at the 11th Annual Meeting of Groupe Francophone des Myélodysplasies, May 26-27 2016, Grenoble.

Abstract: 205 words

Text: 5100 words

References: 60

Tables/figures: 3 figures

RUNNING TITLE: Deregulated miRNome in myelodysplastic mesenchymal stroma cells

KEYS WORDS: Myelodysplastic syndromes, DICER1, microRNA, mesenchymal stromal cells, extracellular vesicles.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) represent a rare group of heterogeneous and clonal diseases affecting hematopoietic stem cell. Nevertheless, physiopathology of MDS remains poorly understood and several studies highlight the role of bone marrow microenvironment notably mesenchymal stromal cell (MSC). DICER1 (an Rnase playing a pivotal role in miRNA processing) down regulation in MSC could induce a MDS.

We confirmed that MDS-derived MSC support an impaired hematopoiesis compared to healthy donor stroma. By flow cytometry on total bone marrow, we confirmed that DICER1 is down regulated in MDS MSC from low risk MDS. Then, we have shown that MDS-derived MSC harbored a dysregulated pattern of miRNA: 16 miRNA upregulated and 7 under-expressed. We identified a potential target for future therapy: miR-486-5p which is constantly upregulated in MDS-derived MSC. Moreover, a possible way of cell to cell communication within the hematopoietic niche could be extracellular vesicles (EVs) and more specifically exosomes. We found that EVs from MDS-derived MSC influence HSC fate by inducing apoptosis and DNA damages due to oxidative stress.

In this study, we demonstrated that bone marrow microenvironment plays an important role in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome by notably a dysregulation of pattern of miRNA and of cell to cell communication with extracellular vesicles.

INTRODUCTION

Myelodysplastic syndromes (MDS) represent a rare group of heterogeneous and clonal diseases affecting hematopoietic stem cell (1). They affect mainly elderly people and are characterized by ineffective hematopoiesis leading to cytopenia (anemia is the most the frequent) contrasting with bone marrow hypercellularity. Disease evolution is enameled by progressive transformation to acute myeloid leukemia in 30% of cases due in part to genomic instability and mutations in the malignant clones (2, 3). Prognosis is determined by IPSS score and more recently IPSS-R allowing a classification in mainly two different stages: low and high risk MDS (4, 5), quantifying the risk of progression to AML. Spliceosome genes and those involved in epigenetic regulation are the most frequent somatic mutations (6, 7).

Nevertheless, physiopathology of MDS remains poorly understood and several studies highlight the role of bone marrow microenvironment. In fact, normal and pathologic hematopoiesis take place in bone marrow in a specialized medullar niche. The majority of the cells constituting this niche derive from the same progenitor: the bone marrow mesenchymal stromal cell (MSC). Defects in non-hematopoietic microenvironment cell population are sufficient to drive myeloid neoplasms. Recent studies show that abnormalities of mesenchymal stromal cells in particular, contribute to the physiopathology of MDS. Genetic deletion of *Dicer1*, which codes for a type III Rnase essential in the genesis of miRNA, in murine osteoprogenitors, led to a pathological microenvironment sufficient to generate myelodysplastic features in the hematopoietic progenitors, leading in the final steps to acute myeloid leukemia (8). This is accompanied by a deregulation of miRNA processing, increased susceptibility to senescence of the mesenchymal stem cells and defects in the support properties of the growth of hematopoietic stem cells (HSC) (9). Kode et al (10) have overexpressed beta-catenin in murine osteoblasts, leading to an aberrant activation of Notch signaling in the hematopoietic progenitors, generating acute myeloid leukemia. These works are strongly in favor of a causal link between the hematopoietic niche and the pathogenesis of MDS in part

due to the deregulation of miRNA. Nevertheless, there are few studies on human microenvironment. Additionally, exosomes are extracellular vesicles that function in cell-cell communication by trafficking protein and RNA species and especially miRNAs to bystander cells. These exosomes are one of the possible way of communication and material transfer between the microenvironment and the hematopoietic cells (11, 12).

In this work, we confirm that DICER1 is less expressed in MDS-derived MSC versus healthy donor MSC. We study the miRNA pattern deregulations in MSC from low risk MDS patients and wondered whether MDS-derived MSC secreted exosomes could influence the fate of healthy donors' hematopoietic stem cells.

MATERIEL AND METHODS

Samples collection

All myelodysplastic samples were collected at the Grenoble University hospital after a written consent and approbation by our local ethical committees. All normal bone marrow samples were also collected after a written consent from patients having a heart surgery or patients requiring medullar exploration for peripheral cytopenia.

Hematopoietic stem progenitor cells (HSPC) were isolated from bone marrow by density gradient using Ficoll (Eurobio), the mononuclear cells were isolated from total bone marrow and were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Then HSPC were positively selected by paramagnetic iron-dextran particles directly conjugated to anti-CD34 monoclonal antibodies (CD34 MicroBead Kit, human, Miltenyi Biotec) by using an automatized system (MACS pro, Miltenyi Biotec). The number of HSPC and their viability were assessed with a Luna^{TM} automated cells counter (Logos Biosystems, Korea). The purity of all samples was checked by flow cytometry (BD FACS Quanto II, BD Biosciences) with a specific CD34 fluorochrome-conjugated antibody (CD34APC, Miltenyi Biotec) and was superior to 90% for all samples.

Mesenchymal stromal cells were obtained from total bone marrow or from the CD34 negative fraction. Cells were cultured with DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Life technologies, Paisley, UK) plus Fetal serum bovine (Life technologies™) at 10%, antibiotics (penicillin and streptomycin, Life technologies™) and L.glutamine at 1% (Glutamax – Life technologies™). Then MSC were adherent to plastic and after multiple washes by phosphate buffering saline, a pure population of MSC was obtained and confirmed by flow cytometry (BD FACS Quanto II, BD Biosciences) using CD73 (CD73APC, Miltenyi Biotec), CD90 (CD90PE-CY^{TM} 7, BD Biosciences), CD105 (CD105PE, Miltenyi Biotec) and CD45 (CD45V500, BD horizon^{TM}, BD Biosciences). All MSC were positive > 95% for CD73, CD90 and C105 and

negative for CD45. Moreover, we have checked their ability for trilineage adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation, meeting the conventional criteria for MSC (13). The methods and results of the trilineage differentiation assay are described in supplementary data figure 1.

Flow cytometry and RT-qPCR analyses for DICER1

To assess flow cytometer analyses, bone marrow was filtered with a 24G needle. After red blood cell lysis (FACS™ Lysing solution, BD Biosciences, San Jose, USA) antibodies for MSC characterization were added: CD45, CD105, CD73 and CD90. Then the mix was fixed and cells were permeabilized by using a commercial solution (Cytofix-Cytoperm, BD Biosciences). Then antibody against DICER1 was added (DICER1-APC, BIOSS, Woburn, USA) and incubated overnight at 4°C in dark. The MSC were selected on the absence of CD45 and the positivity for CD90, CD105 and CD73. Dicer1's fluorescence was measured on this population (supplementary data, figure 3). The results are given by relative fluorescence intensity (RFI) defined as the ratio of specific fluorescence (mean fluorescence of MSC incubated with the APC anti-DICER1 antibody) over non-specific fluorescence (mean fluorescence of MSC incubated without APC anti-DICER1 antibody). RNA from MSC of MDS patients and healthy were extracted with TRIzol® Reagent (Life technologies). Quantity and quality were tested by spectrophotometry (Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific) and analyzed by Gel electrophorese (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). Then the retro-transcription was done with SuperScript®II reserve trasncriptase (Invitrogen™) according to the manufacturer's instructions. qPCR were done on 900HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems™) with a commercial probe for DICER1 (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems™) and GAPDH (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems™) was used as housekeeping gene.

RNA Extraction and Quality Check of miRNA

The *mir*Vana™ miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) was used to extract total RNA from MSC and HSPC, including miRNA, according to the manufacturer's instruction. Concerning the small extracellular vesicles, RNA extraction was done using the Cell to Ct kit (TaqMan™ MicroRNA cells-to-CT™ kit, invitrogen). NanoDrop (Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific) allowed quantification of RNA. For the quality control, RNA purity and integrity were evaluated by the OD 260/280 ratio, and analyzed by Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Affymetrix miRNA Array Methods

The Affymetrix Genechip miRNA 4.0 array processing was performed according to the manufacturer's protocol. 100ng for each RNA samples were labeled with the Affymetrix® FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kits (Affymetrix, Santa Clara, CA). The labeled RNA was quantified, fractionated, and hybridized to the miRNA microarray according to the standard procedures provided by the manufacturer. The labeled RNA was heated to 99°C for 5 minutes and then incubated at 45°C for 5 minutes. RNA-array hybridization was performed with agitation at 60 rotations per minute for 16 to 18 hours at 48°C on an Affymetrix 450 Fluidics Station (Affymetrix). The chips were washed and stained according to the manufacturer's procedure and finally scanned with an Affymetrix GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). Signal values were computed using the Affymetrix GeneChip Command Console software (Affymetrix).

Raw data were extracted automatically in Affymetrix data extraction protocol using the software provided by Affymetrix GeneChip Command Console Software (AGCC) (Affymetrix). All analyses and results were exported using Affymetrix Expression Console Software. Array data were filtered by probes annotated species. Then the data were

normalizated between each chip using Robust Multichip Average (RMA) method. The comparative analysis between test sample and control sample was carried out using fold-change and independent *T* test in which the null hypothesis was that no difference existed between the 2 groups. The miRNAs not detected in any samples were excluded from analysis. miRNA not expressed completely in either group were also excluded. Significance of differential expression between two groups was estimated by *t* test for those miRNAs of at least a 2-fold reduced or increased mean expression between the 2 groups. All statistical tests of differentially expressed (DE) genes were conducted using the R statistical language v. 3.2.2.

Validation of Microarray Results by Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Microarray expression results of the selected miRNAs including miR-486-5p, miR-181d-5p, miR-125a-3p, miR-30b-5p, miR-330-3p, miR-148b-3p, miR-26b-5p and miR-378f were verified by RT-qPCR. miRNA was obtained with the same extraction kit as described above. 10ng was reverse transcribed to cDNA using TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (life technologies). All primers used for RT and qPCR come from commercial solutions (TaqMan® MicroRNA Assays, life technologies). RT-qPCR was performed using TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG (life technologies) on Stratagene Mx3000p (Agilent Technologies). Each sample was run in triplicates and the expression levels of miRNAs were normalized to 2 endogenous controls RNU6B and miR-26a-3p. The relative expression levels of miRNAs were calculated by a comparative threshold cycle (Ct) method using that formula: ΔCt miR = Ct miR-486-5p - mean (Ct miR 26a-3p, RNU6B). Differences between groups were calculated based on the ΔΔCt measure, where ΔΔCt microRNA = mean (ΔCt MDS) - mean (ΔCt HealthyDonors) and fold changes as relative quantifications of

expression (i.e. FC = $2^{-\Delta\Delta Ct}$). When it was not possible, the results were expressed in ΔCt = Ct selected miR – mean Ct normalizator miR.

Small extracellular vesicles (sEVs) isolation and characterization

For sEVs production, MSC from both groups (low risk MDS and healthy donors) at maximum 6 passages were cultured in DMEM plus fetal bovine serum at 10%, antibiotics (penicillin and streptomycin) and L.glutamine at 1%. The medium was previously ultracentrifuged at 100 000g during 18 hours in order to remove fetal bovine serum EVs. The supernatants were collected after 3 days of incubation and the sEVs were isolated with differential centrifugation as already described (14). All sEVs samples were analyzed by *Nanoparticle Tracking Analysis* on Nanosight NS300 (Malvern, UK). This technique calculates the particles size and concentration based on their Brownian motion but does not provide any functional data. The same acquisition parameters (camera level 11, detection threshold 6) were used all along the different experimentations and the focus was adapted to each sample to improve the sEVs discrimination. PBS used for rinses and dilutions had been filtered at 0.22µm to prevent small impurities able to modify the results. Two dilutions were tested for each sample and repeated recordings were realized. Results were calculated as the mean of the different dilutions, pondered on the number of valid tracks analyzed by the instrument.

Then transmission electron microscopy assay was performed. The sEVs containing pellet obtained by ultracentrifugation was resuspended in 50µL of 2% paraformaldehyde, loaded on Formvar/carbon coated EM grids, and post-fixed in 1% glutaraldehyde. The samples were contrasted with uranyloxalate solution and examined under a transmission electron microscope (JEOL 1200 EX) using a digital camera (Velta, Olympus).

Western blot analyses for CD63, flotillin and Alix. sEVs were lysed at 4°C for 30 min in 1X LAEMMLI lysis buffer (250nM Tris, 10% SDS, 30%glycerol 5% β-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol bleu and protease inhibitor cocktail). Samples were loaded onto a 12% SDS-PAGE gradient under reducing conditions and electroblotted onto nitrocellulose membrane filters. The blots were blocked with 5% non-fat milk in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl plus 0.05% Tween (TBS-T). Membranes were subsequently immunoblotted at 4°C with the appropriate primary antibody mouse anti-human CD63 (1:1000 from PharmiNgen, 556019, BD Bioscience), mouse anti-human Alix (15) (ALG-2 interacting protein X) (1:8000 from Covalab, pab0204, gift from Sadoul R. team) and mouse anti-human flotillin (1:1000 from BD Bioscience, 610820) overnight. Membranes were incubated with goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugated (Santa Cruz Biotechnology; SC-2005) secondary antibody for 1hour at room temperature. Specific bands were visualized using ECL Western Blotting Detection Reagents (Thermoscientific) and ChemiDoc™ Imaging Systems (BIO RAD).

Culture model with incubation sEVs and HSC from healthy donor

Hematopoietic stem cells from healthy donor were thawed and were plated in 12 wells plates during 24 hours in 2ml of Myelocult^{TM} H5100 with 50ng/ml of Flt3-Ligand and Stem Cell Factor and 50ng/ml thrombopoietin and were incubated at 37°C in a 5% carbon dioxide atmosphere. Then EVs from low risk MDS of from HD, at the ratio of 90 000 EVs per HSC, were added to the medium. The concentration of any sEVs samples was determined by NanoSight technology as described above. 48 hours after co-incubation with EVs, cells were harvested and apoptosis, cell cycle and DNA damages assays were done by flow cytometry. Apoptotic cells were determined by the percentage of Annexin V positive cells (FITC Annexin V, BD Biosciences) by flow cytometry, as per the manufacturer's intructions. Cell cycle was studied by DAPI staining (4',6-diamidino-2'-phylindole, dihydrochloride, 1mg/ml, Thermo

SCIENTIFIC). Briefly, cells were permeabilized with commercial solution (Cytofix/cytoperm™, BD Biosciences). After washes with Permwash™ (BD Biosciences), cells were incubated with DAPI at room temperature for 1 hour. DNA content was evaluated by flow cytometry. All flow cytometry analyses were done on BD FACS Canto II.

For colony-forming cell (CFC) assays, 1000 $CD34^+$ cells were seeded in H4434 Methocult (StemCell Technologies) for 2 weeks. Experiments were done in duplicate.

DNA damages were analyzed by confocal microscopy. 1.10^5 cells were permeabilized following the same protocol as for cell cycle. Cytospins were prepared, saturated with PBS BSA 2% during 45 min. γH2AX staining was done overnight at 4°C and with a dilution of 1/400 concentration (Anti-H2AX pS 139-APC, Miltenyi Biotec). After a wash with PBS, 5µL of a mix of Vectashield ™ (Vector laboratories) with Dapi 1/2000 (DAPI antifade ES, Cytocell) was put on cells. Preparations were read on spinning disk confocal microscope (IMIC 2.0 Till Photonics, FEI, Munich) with a camera (iXon 897, EMCCD, Andor). Then the number of γH2AX foci were counted with Icy software (http://icy.bioimageanalysis.org) for at least 60 cells for each condition.

Cellular model with overexpression of miR-486-5p and RNA sequencing

Healthy donor HSPC ($CD34^+$) cells were transfected by electroporation (Amaxa™ Human CD34 Nucleofector™ Kit V, Lonza) with Nucleofector II (Amaxa Biosystem, Lonza) with two different commercial plasmids : one expressing an irrelevant sequence (ref: CmiR0001-MR04, GeneCopoeia™) and one expressing mir-486 (ref: HmiR0130-MR04, GeneCopoeia™). Two days after electroporation, the transfected cells were harvested on the GFP expression by flow cytometry (BD, FACS Aria, San Jose, CA) operating in 4-way yield sort mode, and collected into 5 ml polypropylene tubes. Then the cells were washed in phosphate-buffered saline solution. RNA was extracted as described before.

RESULTS

MDS-derived MSC support an impaired hematopoiesis.

Using a LTC-IC type co-culture model with $CD34^+$ cells from healthy donors and stroma coming from MDS-derived MSC or HD MSC during 3 weeks, we have shown that hematopoietic stem progenitor cells (HSPC) proliferation is decreased on MDS-derived stroma. This due to more apoptosis and less cycling cells on MDS-derived stroma. Methods and results are described in supplementary data, figure 2).

DICER1 is under-expressed in MDS-derived MSC from low risk patients.

We have studied DICER1 expression within MDS-derived MSC and healthy donors (HD) from total bone marrow by flow cytometry. Gating strategy of DICER1 is described in supplementary data figure 3. We have tested MSC from 18 HD and 22 MDS patients. If we consider all the MDS patients tested, we did not find any difference of DICER1 expression ($p=0.07$) (Figure 1A). But if we focused on low risk patients according to IPSS scoring ($n=12$), we found an under expression of DICER1 ($p=0.02$) compared to HD (figure 1A). We did not find any under expression of DICER1 in high risk MDS MSC but on the contrary a tendency of higher expression of DICER1 ($n=0.6$). Then we have checked if this down regulation still exists in expanded MSC. We have tested five low risk MDS patients and five healthy donors by flow cytometry too and we have found that the under-expression of DICER1 is still present in expanded MSC ($p=0.025$) (figure 1B). Finally, we have confirmed the down regulation of DICER1 by RT-qPCR in expanded MSC from 5 low risk MDS patients compared to 5 healthy donors ($p=0.018$) (figure 1C). Therefore, the following steps of the study are focused on low risk MDS patients.

miRnome study of mesenchymal stem cell.

Because DICER1 has a pivotal role in miRNA processing (16), we hypothesize that mesenchymal stromal cell of low risk MDS could present a deregulated miRNA profile in comparison of MSC from healthy donor. To confirm this hypothesis, we have done miRNA profile in MSC of 4 low risk MDS patients and 3 healthy donors using Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 Array which allow the study of 2578 human mature miRNA. After statistical analysis as described above, we found 16 up regulated miR (miR-1246, miR-505-3p, miR-4269, miR-378f, miR-378i, miR-486-3p, miR-26b-5p, miR-148b-3p, miR-224-5p, miR-330-3p, miR-486-5p, miR-30b-5p, miR-503-5p, miR-125a-3p, miR-181d-5p, miR-23c) and 7 down regulated miR (miR-4492, miR-3195, miR-6132, miR-3613-3p, miR-4688, miR-4668-5p, miR-548a-3p) (Figure 1D).

Using different databases (Targetscan, miRTarbase and microT-CDS), we found interestingly that 6 (miR-125a-3p, miR-30b-5p, miR-330-3p, miR-26b-5p and miR-378f, miR148b-3p) of the 16 up regulated miRNA have DICER1 for potential target and could potentially explain the Dicer1 down-regulation in low risk patients MSC. We have done RT-qPCR to confirm the overexpression of these miRNA in MSC from 5 HD and 5 low risk MDS (Figure 1E). We only found miR-26b-5p and miR148b-3p overexpressed in low risk MDS MSC ($p=0.03$).

Functional effects of small extracellular vesicles coming from MDS-derived MSC on healthy donor hematopoietic stem progenitor cells.

A possible way of cell-to-cell communication in the hematopoietic niche is extracellular vesicles. Indeed, distant cells can exchange information by sending out signals composed of a selection of proteins, lipids, and nucleic acids via extracellular vesicles. When vesicles are isolated without specific attention to their size, the smaller fraction (<200 nm) is called small

EVs (17). The small EVs (sEVs) contain exosomes which are the most described vesicles containing protein and RNA species and especially miRNAs. We have isolated small EVs from supernatant of expanded MSC from both healthy donors and low risk MDS patients. This fraction of sEVs was positive for exosome markers: CD63 and flotillin (Supplementary data, figure 4) and transmission electron microscopy images showed vesicles of 80nm with a cup-shapped appearance specific to exosomes testifying of an exosome- enrichment of the small EVs pellet (Supplementary data, figure 4).

To bypass cell contacts and secreted cytokines by the microenvironment, we have done culture models with small EVs isolated from MSC from low risk MDS patients and healthy donors (HD), incubated with HD HSPC. Then, 48 hours after the beginning of the culture, we have done functional analyses on HD $CD34^+$ HSPC. Regarding apoptosis assays, there were more annexin V positive HSPC cells with sEVs from MDS MSC than HSC incubated with sEVs from HD ($p= 0.04$) (Figure 2A). Concerning cell cycle, there was no difference of the percentage of cycling cells with sEVs from MDS MSC or from HD ($p=0.45$) (Figure 2B). Engagement into differentiation of the $CD34^+$ HSPC was studied by the loss of $CD34^+$ marker. No difference between the 2 conditions ($p=0.24$) concerning the percentage of $CD34^+$ cells (Figure 2C) was observed. We have also done clonogenic assay and we did not see any difference in the number of BFU-E and CFU-GM between the two conditions (Figure 2D).

Oxidative stress due to reactive oxygen species (ROS) is involved in MDS development (18-20). We assessed ROS levels and intracellular oxidizing species, such as the superoxide radical anion, were measured with the fluorescent DHE probe. The DHE ratio of specific fluorescence (RFI) was increased of an average of 40% ($p=0.046$) in MDS sEVs condition (Figure 2E). In the same experimental conditions, the mitochondria-targeted superoxide-reacting MitoSOX probe detected an average increase of 212% ($p=0.031$) of RFI with MDS sEVs (Figure 2D). ROS are deleterious for cells and induce DNA damages. One of the earliest

cellular responses to DNA double strand breaks (DSBs) is the phosphorylation of the core histone protein H2AX (γH2AX) (21). We assessed by immuno-fluorescence confocal microscopy the number of γH2AX foci in HSPC treated with sEVs from MDS MSC or HD at D7 of the culture model. sEVs from MDS MSC induced a higher number of γH2AX foci 30.80 (± 2.33) versus 15.80 (± 1.77) per cell for HD MSC derived sEVs (p=0.008) (Figure 2F), suggesting more DNA damages mediated by EVs from MDS MSC.

Mir-486-5p is overexpressed in MDS MSC derived EVs

Then, we focused on miR-486-5p as it could be a potential interesting target. miR-486-5p is implicated in leukemogenesis. Indeed, it is over-expressed in leukemic cells of Down syndrome patients (22). Moreover it is also overexpressed in chronic myeloid leukemia (CML) progenitors (23) and plays a role in MSC senescence (24). DIANA-mirPath v.3 (25) using MicroT-CDS database shows that this upregulated miRNA has a role in pathways involved in myelodysplastic syndrome physiopathology like TGF-beta and PI3K/AKT signaling and it is implicated in fatty acid degradation and folate biosynthesis (Figure 3A). Details of the targeted genes involved in different signaling pathway theoretically regulated by miR-486-5p are given in supplementary data figure 5. We have confirmed miR-486-5p overexpression by RT-qPCR in 5 MSC samples from low risk MDS patients and 5 samples from healthy donors (p=0.007) (Figure 3B).

Furthermore, we hypothesized that sEVs from MDS MSc could be enriched in miR-486-5p. We have measured the expression level of miR-486-5p in sEVs derived from both MDS and HD MSC by RT-qPCR. We found a trend for a higher expression level of this miRNA in sEVs derived from MDS MSC (p=0,17) (Figure 3C). Moreover, we have also measured miR-486-5p expression level in HSPC from healthy donor after co-incubation with MSC derived sEVs from MDS or HD. miR-486-5p was upregulated in HSPC incubated with MDS MSC

396 derived sEVs ($p=0.047$) versus HSPC incubated with HD MSC derived sEVs and HSPC alone
397 (Figure 3D), suggesting that sEVs carry miR-486-5p as a cargo to the HSPC cells.
398

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that bone marrow microenvironment plays an important role in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. MDS-derived MSC support an impaired hematopoiesis compared to healthy donors stromal. We confirmed DICER1 down regulation in MDS-derived MSC and demonstrated that those cells harbored a dysregulated pattern of miRNAs. We identified a potential target in the niche of low risk MDS for future therapy: miR-486-5p. Finally, we found that extracellular vesicles from MDS-derived MSC can influence HSC fate by inducing apoptosis and DNA damages due to oxidative stress.

We confirmed DICER1 down regulation in primary human MSC samples by flow cytometry. Indeed down regulation in MDS MSC was already described in 2 studies but by RT-qPCR and western blot (9, 26) in heterogeneous cohorts. Moreover, interestingly Santamaria et al (26) have described a down regulation of DROSHA, another pivotal RNase in miRNA biogenesis. In the present study, we have shownDICER1 down regulation in a homogeneous cohort of low risk MDS samples with a new method by flow cytometry assay and confirmed by RTqPCR. As we hypothesized, MDS MSC present a dysregulated pattern of miRNAs. Santamaria et al (26) had described a global lower expression of miRNAs MDS-derived MSC versus normal MSC in relation with down regulation of DICER1. They had confirmed this down expression by RT-qPCR for three miRNA involved in hematopoiesis: miR-155, miR-181a and miR-222. Nevertheless, the method used in this study allowed only the study of 384 miRNA. Our data, using Gene Chips from Affymetrix, correspond approximately to a global study of human miRNA with 2578 miRNA tested and these data are currently the only available data of global miRnome study in low risk MDS MSC. Currently, the mechanism by which DICER1 is under-expressed in MDS-derived MSC is still not elucidated. Several mechanisms have been described as potential regulators of DICER1 like transcriptional factors (27, 28), miRNA (29) and hypoxia (30). Luciferase assay with plasmid containing the 3'UTR of

DICER1 and miR-26b-5p are ongoing in order to investigate a possible retro-control of DICER1 by miR-26b-5p.

Genotoxic stress results in the accumulation of DNA damages in HSC contributing to genomic instability leading to tissue failure and malignant transformation. Many studies highlight the role of perturbed signaling from medullary microenvironment and our data are coherent with others data already published. Geyh et al (31) have found that MDS-derived MSC have a reduced ability to support healthy donor HSC in long-term culture assays in comparison with HD MSC. Futhermore, Zhao et al (9) found also a reduced ability to support healthy donor HSC for MSC with a lentiviral down regulation of DICER1. Chen et al (32) have done a transcriptional analysis of highly purified mesenchymal elements directly isolated from the marrow of LR-MDS or healthy donors. Gene set enrichment analysis (GSEA) showed that gene set associated with inflammatory response and cellular stress were enriched in LR-MDS. Moreover, mesenchymal niche may actively contribute to the formation of a MDS driving environment by secreting S100A8 and S100A9 (a subclass of proinflammatory molecules called alarmins). Those alarmins increased DNA damage (number of γH2AX) by TLR activation (33). Recently, Cluzeau et al (34) have shown that MDS patients have a high serum level of S100A9 and it directly suppresses erythropoietin elaboration in myelodysplastic syndromes. Besides pro-inflammatory cytokines signaling, extracellular vesicles could also influence HSC fate. Muntion et al (11) have shown in a co-culture model that sEVs from MDS MSC could induce better clonogenic capacity of $CD34^+$ cells and a little impact on apoptosis confirming a possible role of sEVs in cell-to-cell communication within hematopoietic niche. They clearly demonstrated that sEVs from MSC are incorporated into $CD34^+$ cells. In our study, we showed that sEVs from MDS-derived MSC induce HSC apoptosis and can also promote an oxidative environment with increased ROS level and induction of DNA damages. We failed to demonstrate that sEVs from MDS-derived MSC could induce a higher engagement into

differentiation (loss of $CD34^+$ marker) at D2 of our co-incubation model. We will do further experiments at D7 to confirm those results. Whole exosome sequencing of $CD34^+$ cells beforehand incubated with sEVs from both MDS or HD derived MSC are ongoing. Those experiments will allow us to check if sEVs from MDS-derived MSC induce mutations in the 40 genes known to be the most mutated in MDS, if sEVs can induce intergenic mutations and if the breaks and DNA damages induced by the sEVs can lead to chromosomal structure abnormalities such as deletions, insertions and inversions which are found in advanced MDS with complex karyotype.

Numerous works have shown the pathologic effect of the hematopoietic niche and disrupted miRNA processing to drive MDS development. Our miRNA transcriptomic data on mesenchymal stromal cells revealed that 16 miRNA were overexpressed including miR-486-5p. In silico, miR-486-5p has a role in pathway involved in myelodysplastic syndrome physiopathology like TGF-beta signaling and PI3K and it is implicated in fatty acid degradation and folate biosynthesis. Folates play an important role in DNA metabolism. Under conditions of folate deficiency, deoxyuridine monophosphate (dUMP) accumulates and as a result uracil is incorporated into DNA instead of thymine inducing point mutation, generation of single and double stranded DNA breaks, and chromosome breakage leading to genomic instability (35, 36). Folate deficiency has been shown to result in both hypo and hyper gene specific methylation (37). Hypermethylation is a hallmark of myelodysplastic syndrome (38). Furthermore, Fatty acid (FA) metabolism has been described to keep stem cell capacity of HSC. Indeed, treatment of HSC with a PPAR-δ inhibitor (a master regulator of FA oxidation) reduces asymmetric division and loss of transplantation capacity of HSC in xenograft model (39). FA metabolism is also becoming increasingly relevant to leukemia research. The FA transporter CD36 has been described as a poor prognosis marker in AML (40). Leukemia stem cells (LSC) highly express CD36 and activate lipolysis inducing a metabolic adaptation that protects LSCs

from chemotherapy (41). Furthermore, AML cells co-cultured with adipocytes express a high level of the FA binding protein 4 (FABP4), facilitating intracellular transport of free FA and Shafat et al. (42) showed that inhibition of FABP4 reduces the leukemia burden and improves survival of AML in xenograft model. Regarding PI3K/AKT signaling, Falconi et al (43) have demonstrated that MDS-derived MSC exhibit deregulation of the PI3K/AKT signaling pathways which can contribute to their abnormal phenotype and physiopathology. Concerning TGF-beta signaling, its role in mesenchymal stromal cells notably with aging has been investigated. TGF-β stimulates osteoblast proliferation and inhibits adipocyte differentiation. In this way, a decrease in TGF-β activity would lead to a decrease in the formation of new osteoblasts and an increase in the formation of new adipocytes (44). Furthermore in MDS, TGF-β is secreted at lower concentration compared to healthy donors derived MSC (45). Therefore, this down regulation of TGF-β in MDS-derived MSC may increase the proliferation of T-cells leading to a reduced immunosuppression and an increased apoptosis of MDS cells (46). This cytokine also regulates hematopoietic cell proliferation, differentiation, and apoptosis (47, 48). Indeed, TGF-β negatively regulates hematopoiesis (48). Interestingly, recently Guo et al. (49) have found an under expression of miR486-5p between MDS patients who never progressed to AML versus MDS patients who later progressed to an AML. All these data support the fact that miR-486-5p could be a potential target for therapy. Transcriptomic analyses of healthy donors $CD34^{+}$ in which miR-486-5p is upregulated are ongoing to better identify which signaling pathways are involved by this upregulation.

Using antisense with various nucleic acid analogues like locked nucleic acids (LNAs) or peptide nucleic acids (PNAs), it is possible to silence aberrantly expressed miRNA (50-52). Nevertheless, current antimiR technologies are dependent on the efficiency of specific cell addressing. Cheng et al (53) describe a novel antimiR delivery platform that targets the acidic tumor microenvironment and skirts liver clearance. However, mimicking physiology may be

the best way to deliver an antimiR. Indeed, patient-derived exosomes have been employed as a novel cancer therapeutic in several clinical trials but lack sufficient efficacy (54, 55) and several groups are working on specialized therapeutic exosomes. Recently, Kamerkar et al. (56) have engineered exosomes derived from fibroblast-like mesenchymal cells to carry siRNA to pancreatic cancer cells with a specific outer membrane addressing of the exosomes.

Furthermore, other overexpressed miRNAs are also potential targets for future therapy. miR-125a which has already been demonstrated to play an important role in MDS $CD34^+$ with a fine tuning of NFKB pathway (57), miR-148b which is down-regulated in CML and can predict clinical behavior of patients stopping imatinib (58) and miR-378 which is found deregulated in a particular MDS (del5q syndrome) and in a specific myeloproliferative neoplasm (polycythemia vera) (59, 60).

Together those finding support the view that medullar microenvironment could drive MDS initiation by inducing genotoxic stress by extracellular vesicles cell communication.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Contribution: MM, NM, AG, DL and VP performed experiments; AG and JPI analyzed the transcriptomics results, MM and SP designed the research, analyzed results and wrote the paper. PH, BP and JYC reviewed the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

MM has received a financial grant from Université Grenoble Alpes (Programme AGIR 2014) and from Bourse “Espoir Sandrine”.

We thank the Rémy Sadoul’s research group of the Grenoble Institute of Neuroscience - University Grenoble Alpes for access to Nanosight and advices on particle analysis.

We thank also Cecile Martin for providing us healthy donor bone marrows.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no major conflict of interest.

REFERENCES

1. Nilsson L, Eden P, Olsson E, Mansson R, Astrand-Grundstrom I, Strombeck B, et al. The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q myelodysplastic syndromes. Blood. 2007;110(8):3005-14. Epub 2007/07/10.
2. Kuramoto K, Ban S, Oda K, Tanaka H, Kimura A, Suzuki G. Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome cells. Leukemia. 2002;16(11):2253-8. Epub 2002/10/26.
3. Mufti GJ. Emerging therapeutic and supportive care approaches for the myelodisplastic syndromes. Reviews in clinical and experimental hematology. 2004;8(2):E4. Epub 2005/07/20.
4. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood. 1997;89(6):2079-88. Epub 1997/03/15.
5. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. Blood. 2012;120(12):2454-65. Epub 2012/06/29.
6. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. Blood. 2013;122(22):3616-27; quiz 99.
7. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2014;28(2):241-7. Epub 2013/11/14.
8. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. Nature. 2010;464(7290):852-7. Epub 2010/03/23.
9. Zhao Y, Wu D, Fei C, Guo J, Gu S, Zhu Y, et al. Down-regulation of Dicer1 promotes cellular senescence and decreases the differentiation and stem cell-supporting capacities of mesenchymal stromal cells in patients with myelodysplastic syndrome. Haematologica. 2015;100(2):194-204. Epub 2014/11/02.
10. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Rathinam CV, Luo N, et al. Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts. Nature. 2014;506(7487):240-4. Epub 2014/01/17.
11. Muntion S, Ramos TL, Diez-Campelo M, Roson B, Sanchez-Abarca LI, Misiewicz-Krzeminska I, et al. Microvesicles from Mesenchymal Stromal Cells Are Involved in HPC-Microenvironment Crosstalk in Myelodysplastic Patients. PloS one. 2016;11(2):e0146722. Epub 2016/02/03.
12. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107(14):6328-33. Epub 2010/03/23.

13. Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. Cytotherapy. 2013;15(9):1054-61. Epub 2013/04/23.
14. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al]. 2006;Chapter 3:Unit 3 22. Epub 2008/01/30.
15. Mercier V, Laporte MH, Destaing O, Blot B, Blouin CM, Pernet-Gallay K, et al. ALG-2 interacting protein-X (Alix) is essential for clathrin-independent endocytosis and signaling. Scientific reports. 2016;6:26986. Epub 2016/06/01.
16. Foulkes WD, Priest JR, Duchaine TF. DICER1: mutations, microRNAs and mechanisms. Nature reviews Cancer. 2014;14(10):662-72. Epub 2014/09/02.
17. Tkach M, Thery C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. Cell. 2016;164(6):1226-32. Epub 2016/03/12.
18. Novotna B, Bagryantseva Y, Siskova M, Neuwirtova R. Oxidative DNA damage in bone marrow cells of patients with low-risk myelodysplastic syndrome. Leukemia research. 2009;33(2):340-3. Epub 2008/08/09.
19. Chung YJ, Robert C, Gough SM, Rassool FV, Aplan PD. Oxidative stress leads to increased mutation frequency in a murine model of myelodysplastic syndrome. Leukemia research. 2014;38(1):95-102. Epub 2013/08/21.
20. Meunier M, Ancelet S, Lefebvre C, Arnaud J, Garrel C, Pezet M, et al. Reactive oxygen species levels control NF-kappaB activation by low dose deferasirox in erythroid progenitors of low risk myelodysplastic syndromes. Oncotarget. 2017;8(62):105510-24. Epub 2017/12/30.
21. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. The Journal of biological chemistry. 1998;273(10):5858-68. Epub 1998/04/16.
22. Shaham L, Vendramini E, Ge Y, Goren Y, Birger Y, Tijssen MR, et al. MicroRNA-486-5p is an erythroid oncomiR of the myeloid leukemias of Down syndrome. Blood. 2015;125(8):1292-301.
23. Wang LS, Li L, Chu S, Shiang KD, Li M, Sun HY, et al. MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and enhances growth and modulates drug response in CML progenitors. Blood. 2015;125(8):1302-13. Epub 2014/12/18.
24. Kim YJ, Hwang SH, Lee SY, Shin KK, Cho HH, Bae YC, et al. miR-486-5p induces replicative senescence of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and its expression is controlled by high glucose. Stem Cells Dev. 2012;21(10):1749-60.
25. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. Nucleic acids research. 2015;43(W1):W460-6. Epub 2015/05/16.

26. Santamaria C, Muntion S, Roson B, Blanco B, Lopez-Villar O, Carrancio S, et al. Impaired expression of DICER, DROSHA, SBDS and some microRNAs in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients. Haematologica. 2012;97(8):1218-24. Epub 2012/03/01.
27. Levy C, Khaled M, Robinson KC, Veguilla RA, Chen PH, Yokoyama S, et al. Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes. Cell. 2010;141(6):994-1005. Epub 2010/06/17.
28. Su X, Chakravarti D, Cho MS, Liu L, Gi YJ, Lin YL, et al. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. Nature. 2010;467(7318):986-90. Epub 2010/10/22.
29. Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, et al. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. Cell. 2010;141(7):1195-207. Epub 2010/07/07.
30. van den Beucken T, Koch E, Chu K, Rupaimoole R, Prickaerts P, Adriaens M, et al. Hypoxia promotes stem cell phenotypes and poor prognosis through epigenetic regulation of DICER. Nature communications. 2014;5:5203. Epub 2014/10/30.
31. Geyh S, Oz S, Cadeddu RP, Frobel J, Bruckner B, Kundgen A, et al. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. Leukemia. 2013;27(9):1841-51.
32. Chen S, Zambetti NA, Bindels EM, Kenswill K, Mylona AM, Adisty NM, et al. Massive parallel RNA sequencing of highly purified mesenchymal elements in low-risk MDS reveals tissue-context-dependent activation of inflammatory programs. Leukemia. 2016;30(9):1938-42. Epub 2016/04/26.
33. Zambetti NA, Ping Z, Chen S, Kenswil KJ, Mylona MA, Sanders MA, et al. Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. Cell stem cell. 2016;19(5):613-27. Epub 2016/09/27.
34. Cluzeau T, McGraw KL, Irvine B, Masala E, Ades L, Basiorka AA, et al. Pro-inflammatory proteins S100A9 and tumor necrosis factor-alpha suppress erythropoietin elaboration in myelodysplastic syndromes. Haematologica. 2017;102(12):2015-20. Epub 2017/10/07.
35. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(7):3290-5. Epub 1997/04/01.
36. Duthie SJ, Narayanan S, Brand GM, Pirie L, Grant G. Impact of folate deficiency on DNA stability. The Journal of nutrition. 2002;132(8 Suppl):2444S-9S. Epub 2002/08/07.
37. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2004;22(22):4632-42. Epub 2004/11/16.
38. Karlic H, Herrmann H, Varga F, Thaler R, Reitermaier R, Spitzer S, et al. The role of epigenetics in the regulation of apoptosis in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. Critical reviews in oncology/hematology. 2014;90(1):1-16. Epub 2013/11/05.

643 39. Ito K, Carracedo A, Weiss D, Arai F, Ala U, Avigan DE, et al. A PML-PPAR-delta pathway
644 for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. Nature medicine.
645 2012;18(9):1350-8. Epub 2012/08/21.
646 40. Perea G, Domingo A, Villamor N, Palacios C, Junca J, Torres P, et al. Adverse prognostic
647 impact of CD36 and CD2 expression in adult de novo acute myeloid leukemia patients. Leukemia
648 research. 2005;29(10):1109-16. Epub 2005/08/13.
649 41. Ye H, Adane B, Khan N, Sullivan T, Minhajuddin M, Gasparetto M, et al. Leukemic Stem Cells
650 Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. Cell stem cell.
651 2016;19(1):23-37. Epub 2016/07/05.
652 42. Shafat MS, Oellerich T, Mohr S, Robinson SD, Edwards DR, Marlein CR, et al. Leukemic blasts
653 program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. Blood.
654 2017;129(10):1320-32. Epub 2017/01/05.
655 43. Falconi G, Fabiani E, Fianchi L, Criscuolo M, Raffaelli CS, Bellesi S, et al. Impairment of
656 PI3K/AKT and WNT/beta-catenin pathways in bone marrow mesenchymal stem cells isolated from
657 patients with myelodysplastic syndromes. Experimental hematology. 2016;44(1):75-83 e1-4. Epub
658 2015/11/02.
659 44. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and
660 suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2
661 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. Aging cell. 2004;3(6):379-89. Epub
662 2004/12/01.
663 45. Najar M, Raicevic G, Id Boufker H, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Meuleman N, et al.
664 Modulated expression of adhesion molecules and galectin-1: role during mesenchymal stromal cell
665 immunoregulatory functions. Experimental hematology. 2010;38(10):922-32. Epub 2010/06/24.
666 46. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human
667 bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific
668 mitogenic stimuli. Blood. 2002;99(10):3838-43. Epub 2002/05/03.
669 47. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the
670 regulation of hematopoiesis. Blood. 2000;96(6):2022-36. Epub 2000/09/09.
671 48. Ruscetti FW, Akel S, Bartelmez SH. Autocrine transforming growth factor-beta regulation of
672 hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. Oncogene. 2005;24(37):5751-63. Epub
673 2005/08/27.
674 49. Guo Y, Strickland SA, Mohan S, Li S, Bosompem A, Vickers KC, et al. MicroRNAs and tRNA-
675 derived fragments predict the transformation of myelodysplastic syndromes to acute myeloid leukemia.
676 Leukemia & lymphoma. 2017;58(9):1-15. Epub 2017/01/14.
677 50. Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, et al. LNA-mediated microRNA
678 silencing in non-human primates. Nature. 2008;452(7189):896-9. Epub 2008/03/28.

51. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. Nature. 2005;438(7068):685-9. Epub 2005/11/01.
52. Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. Nature reviews Cancer. 2011;11(12):849-64. Epub 2011/11/25.
53. Cheng CJ, Bahal R, Babar IA, Pincus Z, Barrera F, Liu C, et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment. Nature. 2015;518(7537):107-10. Epub 2014/11/20.
54. Viaud S, Thery C, Ploix S, Tursz T, Lapierre V, Lantz O, et al. Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? Cancer research. 2010;70(4):1281-5. Epub 2010/02/11.
55. Dai S, Wei D, Wu Z, Zhou X, Wei X, Huang H, et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2008;16(4):782-90. Epub 2008/03/26.
56. Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. Nature. 2017;546(7659):498-503. Epub 2017/06/14.
57. Ganan-Gomez I, Wei Y, Yang H, Pierce S, Bueso-Ramos C, Calin G, et al. Overexpression of miR-125a in myelodysplastic syndrome CD34+ cells modulates NF-kappaB activation and enhances erythroid differentiation arrest. PloS one. 2014;9(4):e93404. Epub 2014/04/03.
58. Ohyashiki JH, Ohtsuki K, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Katagiri S, Umezu T, et al. Downregulated microRNA-148b in circulating PBMCs in chronic myeloid leukemia patients with undetectable minimal residual disease: a possible biomarker to discontinue imatinib safely. Drug design, development and therapy. 2014;8:1151-9. Epub 2014/09/05.
59. Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, Mendell J, Prchal JT. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. Experimental hematology. 2007;35(11):1657-67. Epub 2007/11/03.
60. Merkerova MD, Krejcik Z, Belickova M, Hrustincova A, Klema J, Stara E, et al. Genome-wide miRNA profiling in myelodysplastic syndrome with del(5q) treated with lenalidomide. European journal of haematology. 2015;95(1):35-43. Epub 2014/10/08.

TABLES AND FIGURES LEGENDS

Figure 1: A) Results of DICER1 RFI from total bone marrow MSC harvested from healthy donors or MDS patients. **B)** Results of DICER1 RFI from cultured MSC harvested from healthy donors or low risk MDS patients. **C)** Results of *Dicer1* RT-qPCR from cultured MSC harvested from healthy donors or low risk MDS patients. Results are given as Delta Ct: ΔCt = Ct Dicer1 –Ct GAPDH. **D)** Heat map of miRNA with at least a 2-fold reduced or increased mean expression in MDS MSC versus healthy donor MSC. Sixteen miR were upregulated and 7 seven were down regulated. **E)** Results of RT-qPCR of the 6-upregulated miRNA in MDS MSC theoretically targeting *Dicer1*. Results are given as Delta Ct: ΔCt = Ct miRNA – mean Ct (RNU6B/miR-26a-3p).

HD: Healthy donor; MDS: myelodysplastic syndrome; MSC: Mesenchymal stromal cell; miRNA: microRNA; ns: no significant; RFI: ratio of specific fluorescence, RT-qPCR: Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

Figure 2: Functional results at Day 2 of the co-incubation cultures ($CD34^+$ cells with MSC derived sEVs) A) Results of apoptosis assay (percentage of annexin V positive cells) assessed by flow cytometry using annexin V staining. Results are normalized to the healthy donor conditions in each case. **B)** Results of Cell cycle assessed by flow cytometry with DAPI staining. Histograms correspond to cells in mitosis and S-phase. **C)** Flow cytometry analysis of CD34 staining (n=4). **D)** Results of clonogenic assay done at Day 2 of the co-incubation model. **E)** Flow cytometry analysis of intracellular ROS with DHE staining (n=7) and mitochondrial ROS with MitoSOX probe (n=7). Data are RFI and are normalized to the healthy donor conditions in each case. **F)** Results of confocal immunofluorescence microscopy assays for γH2AX (n=3). Nuclei are stained in blue; the red signal represents the γH2AX γ foci; x 63. Histogram representing the number of γH2AX foci per cells. Data were analyzed by a specific

740 software (ICY) to determine the number of γH2AX foci in the nucleus. The positive control is
741 K562 cells line incubated with aracytine.
742
743 **Figure 3: A)** Heat map showing the main target cellular pathways affected by the up regulation
744 of miR-486-5p using DIANA-miRPath v3.0. The red boxes indicate a potential miR role in this
745 signaling pathway and the opposite for the yellow boxes. We choose to indicate also the
746 signaling pathway potentially targeting by miR-486-3p. According to the biogenesis of
747 miRNA, miR-486-3p is also upregulated in MDS derived MSC. **B)** Results of RT-qPCR of
748 miR-486-5p in 5 MDS MSC and 5 HD. Results are given as Delta Ct: ΔCt = Ct miRNA – mean
749 Ct (RNU6B/miR-26a-3p). **C)** Results of RT-qPCR of miR-486-5p in small EVs from MDS
750 MSc and HD MSC. Results are given as Delta Ct: ΔCt = Ct miRNA – mean Ct (RNU6B/miR-
751 26a-3p). **D)** Results of RT-qPCR of miR-486-5p in HSPC from healthy donors incubated with
752 sEVs from MDS MSC and HD MSC. Results are given using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula.
753

FIGURE 1

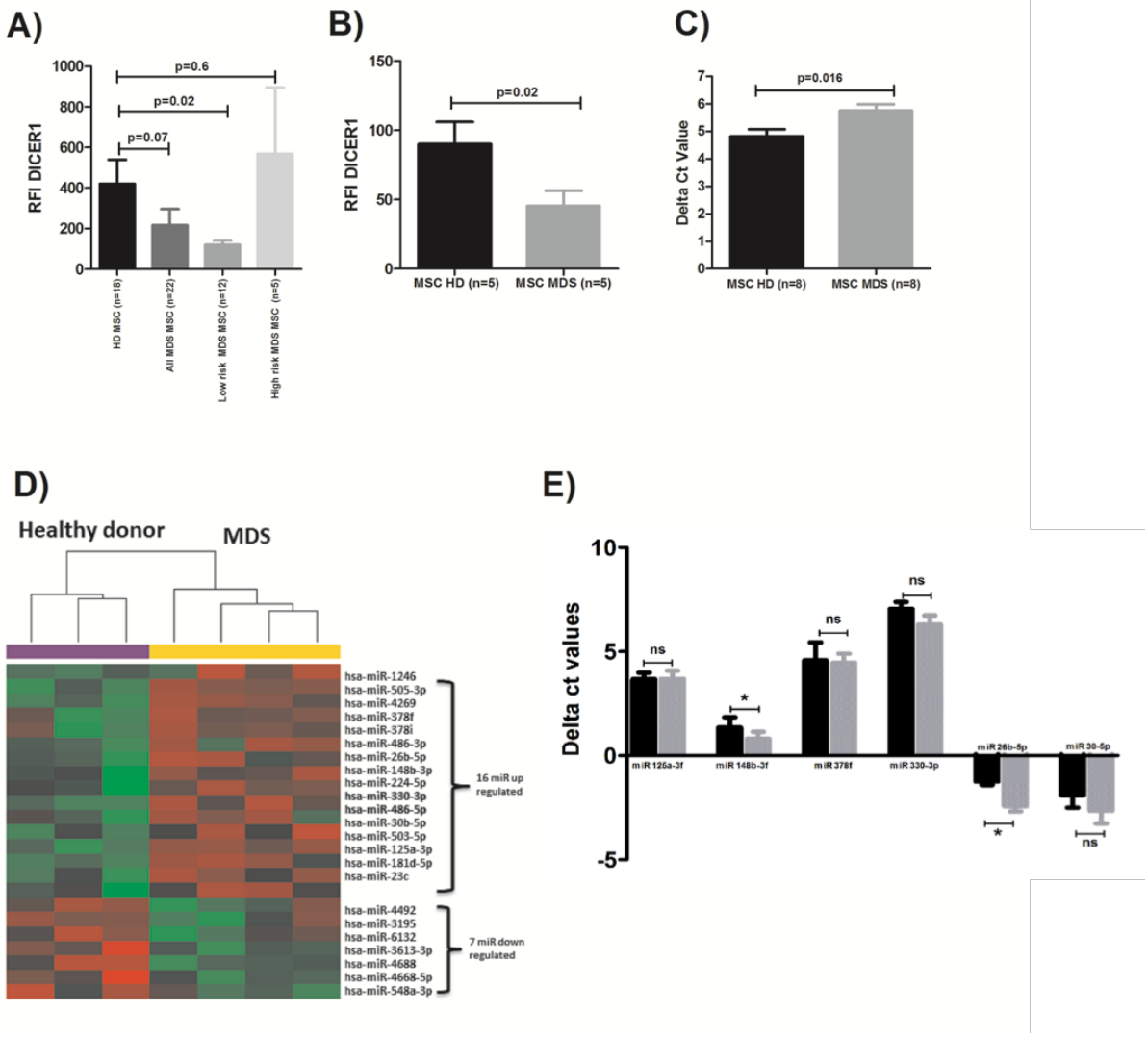

A)
RFI DICER1
1000
800
600
400
200
0
p=0.6
p=0.02
p=0.07
HD MSC (n=18)
All MDS MSC (n=22)
Low risk MDS MSC (n=12)
High risk MDS MSC (n=5)
B)
RFI DICER1
150
100
50
0
p=0.02
MSC HD (n=5)
MSC MDS (n=5)
C)
Delta Ct Value
7
6
5
4
3
2
1
0
p=0.016
MSC HD (n=8)
MSC MDS (n=8)
D)
Healthy donor
MDS
hsa-miR-1246
hsa-miR-505-3p
hsa-miR-4269
hsa-miR-378f
hsa-miR-378i
hsa-miR-486-3p
hsa-miR-26b-5p
hsa-miR-148b-3p
hsa-miR-224-5p
hsa-miR-330-3p
hsa-miR-486-5p
hsa-miR-30b-5p
hsa-miR-503-5p
hsa-miR-125a-3p
hsa-miR-181d-5p
hsa-miR-23c
16 miR up regulated
hsa-miR-4492
hsa-miR-3195
hsa-miR-6132
hsa-miR-3613-3p
hsa-miR-4688
hsa-miR-4668-5p
hsa-miR-548a-3p
7 miR down regulated
E)
Delta ct values
10
5
0
-5
ns
*
ns
ns
*
ns
miR 126a-3f
miR 148b-3f
miR 378f
miR 330-3p
miR 26b-5p
miR 30-5p

FIGURE 2

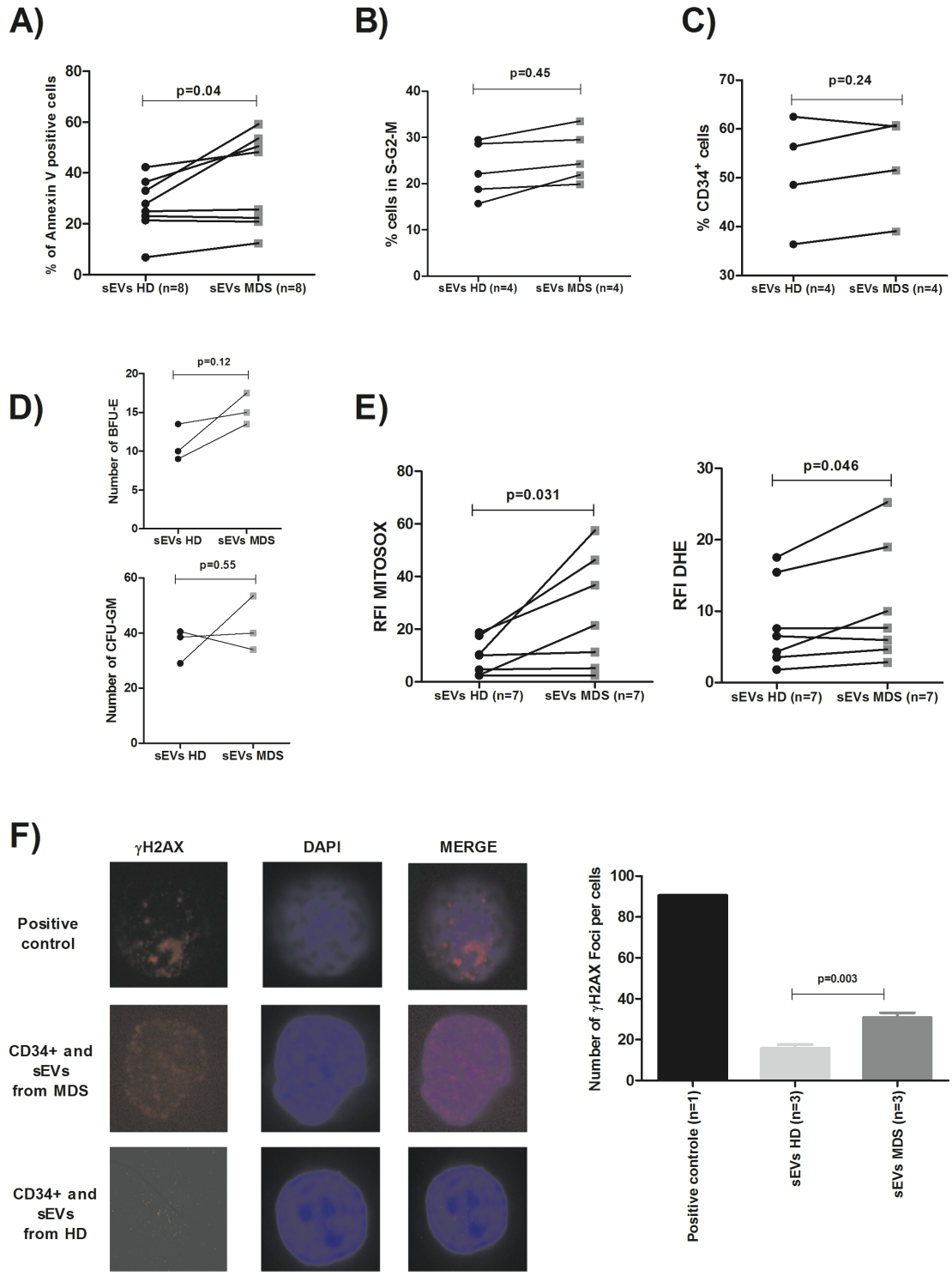
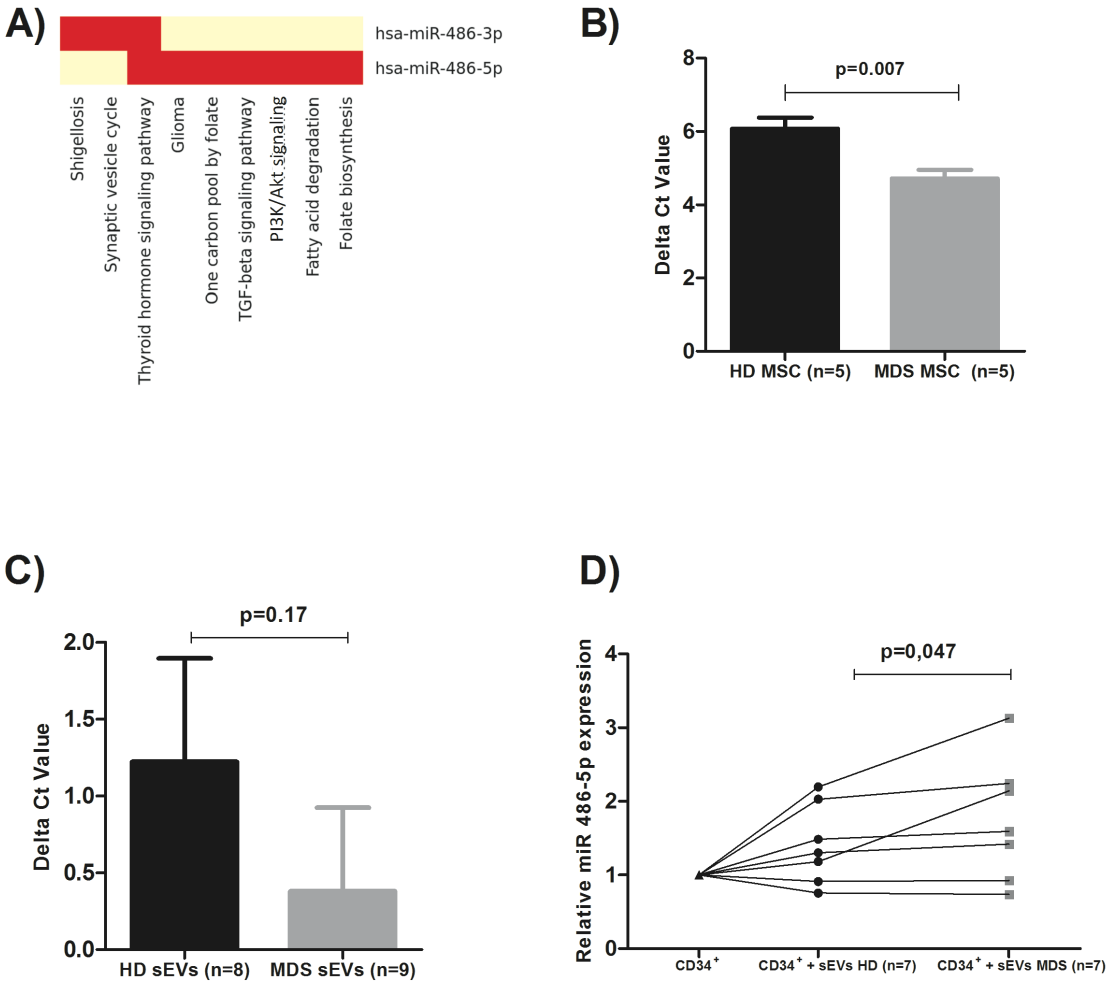
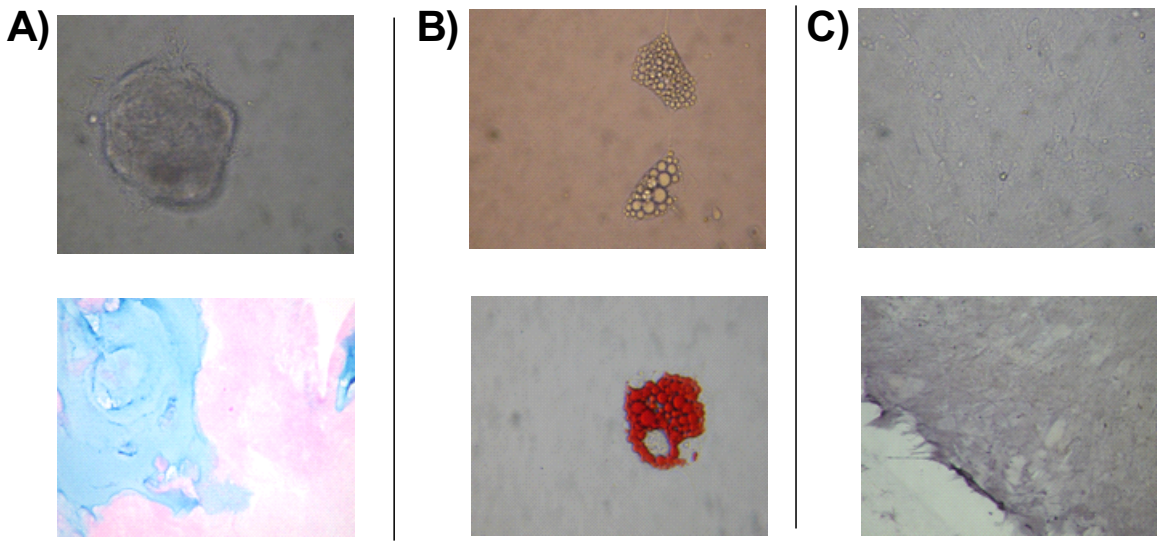

A)
% of Annexin V positive cells
p=0.04
sEVs HD (n=8)
sEVs MDS (n=8)
B)
% cells in S-G2-M
p=0.45
sEVs HD (n=4)
sEVs MDS (n=4)
C)
% CD34+ cells
p=0.24
sEVs HD (n=4)
sEVs MDS (n=4)
D)
Number of BFU-E
p=0.12
sEVs HD
sEVs MDS
Number of CFU-GM
p=0.55
sEVs HD
sEVs MDS
E)
RFI MITOSOX
p=0.031
sEVs HD (n=7)
sEVs MDS (n=7)
RFI DHE
p=0.046
sEVs HD (n=7)
sEVs MDS (n=7)
F)
γH2AX
DAPI
MERGE
Positive control
CD34+ and sEVs from MDS
CD34+ and sEVs from HD
Number of γH2AX Foci per cells
p=0.003
Positive controle (n=1)
sEVs HD (n=3)
sEVs MDS (n=3)

FIGURE 3


A)
hsa-miR-486-3p
hsa-miR-486-5p
Shigellosis
Synaptic vesicle cycle
Thyroid hormone signaling pathway
Glioma
One carbon pool by folate
TGF-beta signaling pathway
PI3K/Akt signaling
Fatty acid degradation
Folate biosynthesis
B)
p=0.007
Delta Ct Value
HD MSC (n=5)
MDS MSC (n=5)
C)
p=0.17
Delta Ct Value
HD sEVs (n=8)
MDS sEVs (n=9)
D)
p=0,047
Relative miR 486-5p expression
CD34+
CD34+ + sEVs HD (n=7)
CD34+ + sEVs MDS (n=7)

SUPPLEMENTARY DATA

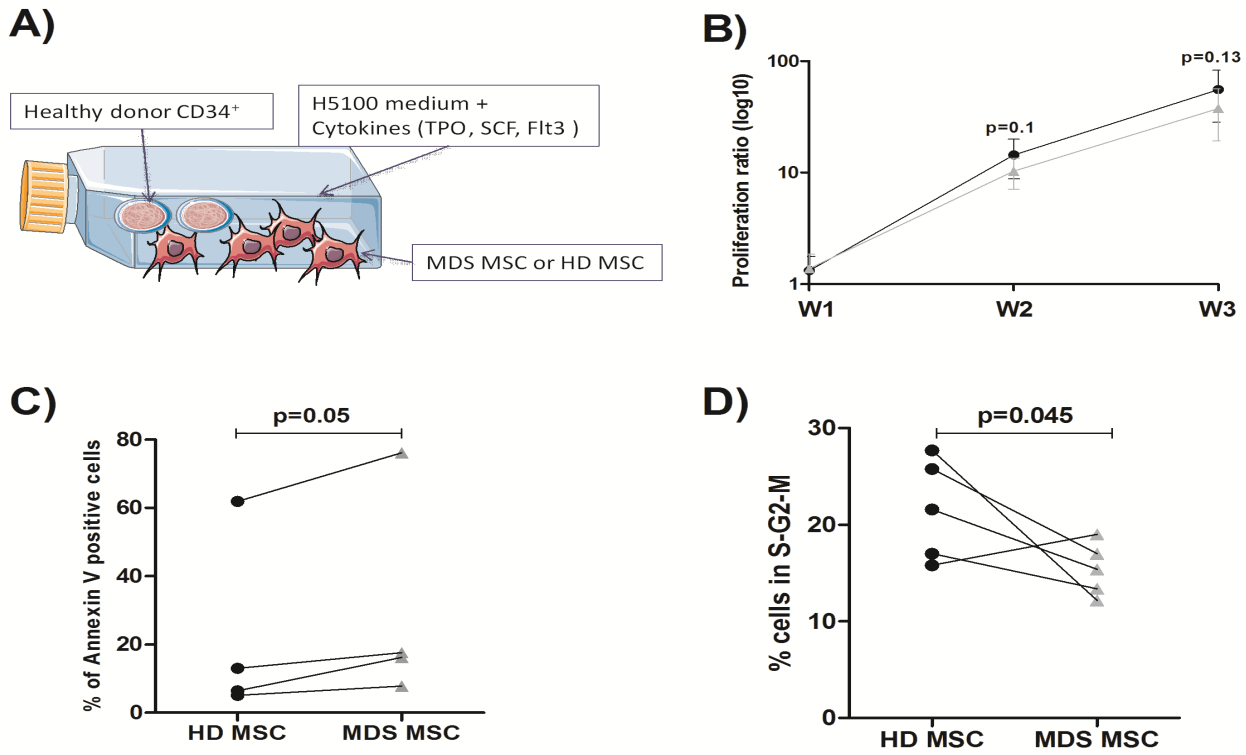
Sup Fig 1. Results confirming the ability for trilineage differentiation of mesenchymal stromal cells (adipogenic, osteogenic and chondrogenic).



A) Chondrocyte before and after alcian blue staining, X400. **B)** Adipocyte before and after red oil staining, X400. **C)** Osteocyte before and after alkaline phosphatase staining, X40.

Methods: Osteoblastic, adipogenic and chondrogenic differentiation medium used were commercial solutions (StemMACS™ OsteoDiff Media, StemMACS™ AdipoDiff Media, StemMACS™ ChondroDiff Media, MACS, Miltenyi Biotec). Culture medium were replaced every 4 days for 21 days. Then osteogenic differentiation was evaluated by alkaline phosphatase staining (SIGMA FAST™ 5-Bromo-4-chloro-3-Indonyl phosphate, Sigma-Aldrich), adipogenic differentiation by staining with Oil Red O (Abcam®) and chondrogenic differentiation by sulfated proteoglycans staining with alcian blue (Leica Biosystems)

Sup Figure 2. Functional effects of MDS mesenchymal stroma cells on healthy donor hematopoietic stem cells.

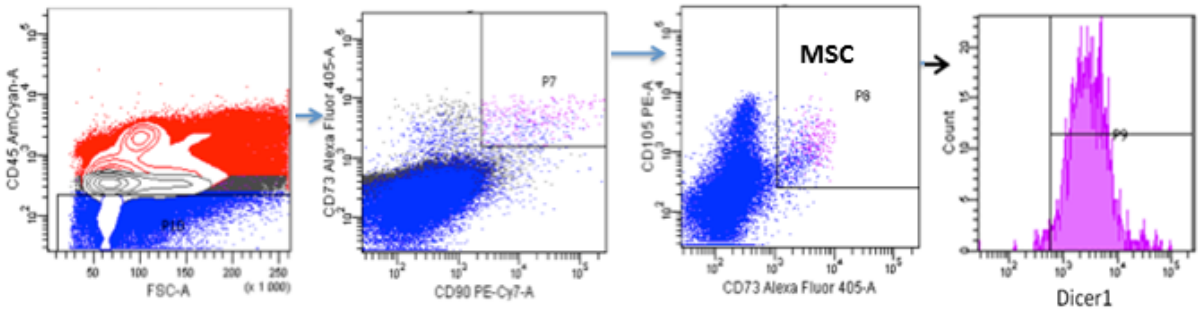


A) Schema representing the co-culture model of $CD34^+$ cells from healthy donor with two different type of stroma: MDS or healthy donors derived. **B)** Cell proliferation rates of hematopoietic stem progenitor cells according to different type of stroma: MDS or healthy donors derived. Proliferation rates were given as a proliferation ratio (PR) consisting in the number of cells counted at each day of analysis divided by the initial number of $CD34^+$. **C)** Results of apoptosis assay (% of annexin V positive cells) assessed by flow cytometry using annexin V staining at the third week of culture **D)** Cell cycle was analyzed by flow cytometry with DAPI staining at the third week of culture.

Methods: $2x10^5$ MSC obtained from total bone marrow of low risk MDS patients or from healthy donors were seeded in $25cm^2$ culture flask (BD Falcon™) with 3ml of DMEM plus Fetal serum bovine at 10%, antibiotics and L.glutamine at 1%. When they reached 90% of

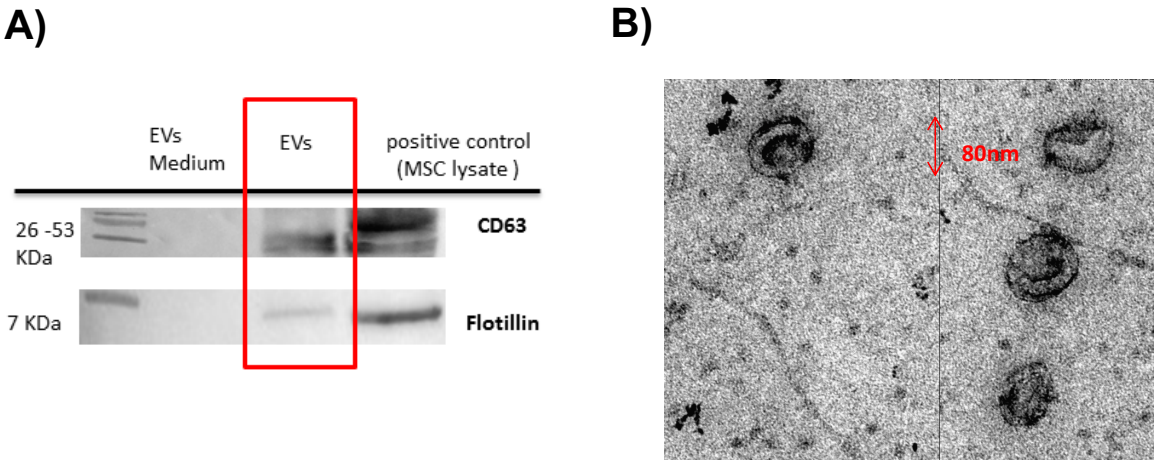
812 confluence, HSC were added with 4ml of Myelocult^{TM} H5100 (Stemcell technologies) with
813 50ng/ml of Flt3-Ligand (Peprotech), Stem Cell Factor (Peprotech) and thrombopoietin
814 (Peprotech). Then cells were incubated 37°C in a 5% carbon dioxide atmosphere. Each flask
815 represents one week of coculture and analyses were done during three weeks. One ml of culture
816 medium (H5100 plus cytokines) was added weekly.
817

Sup Figure 3. Isolation of mesenchymal stromal cells from total bone marrow by flow cytometry.



Firstly, cells are selected by the absence of CD45 and then the triple positive population (CD105, CD73 and CD90) is selected and Dicer1 fluorescence is measured on this population. The results are given by relative fluorescence intensity (RFI) defined as the ratio of specific fluorescence (mean fluorescence of MSC incubated with the APC anti-DICER1 antibody) over non-specific fluorescence (mean fluorescence of MSC incubated without APC anti-DICER1 antibody).

Sup Figure 4. Small extracellular vesicles containing the exosomal fraction.



A) Results of western blot on small extracellular vesicles (sEVs) pellet. sEVs were positive for 2 specific proteins of exosomes membrane CD63 and Flotillin. **B)** Typical image of exosome in transmission electron microscopy x10^5

Sup Figure 5. Targeted genes involved in different signaling pathway theoretically regulated by miR-486-5p.

	Fatty acid degradation	Thyroid hormone signaling pathway	Folate biosynthesis	PI3K/AKT signaling pathway	TGF-beta signaling pathway	One carbon pool by folate	Glioma
Targeted genes	EHHADH	RAF1	DHFR	PIK3R1	SMAD2	DHFR	CDK4
		THRA	DHFRL1	FGF9	SMURF2	DHFRL1	PIK3R1
		PLCB1		IGF1	ID4		IGF1
		PIK3R1		PDGFC	BMPR1A		PTEN
		THRB		PTEN	MAPK1		MAPK1
		RXRB		MAPK1			
		FOXO1		FGF7			
		MAPK1		CDK4			

3) Conclusion et perspective

Nous avons confirmé la sous-expression de la protéine DICER1 au sein des cellules stromales mésenchymateuses de patients SMD et démontré que ces cellules présentaient un profil d'expression particulier de miARN. Les mécanismes à l'origine de cette sous-expression ne sont toujours pas élucidés. Cependant la surexpression de 2 miR ciblant l'ARNm de DICER1 et significativement surexprimés dans les CSM SMD pourrait l'expliquer en partie. Les résultats qui seront obtenus avec les constructions luciférases (en aval de Dicer1) pourront apporter des réponses.

Enfin, nous avons démontré que les vésicules extracellulaires des cellules stromales mésenchymateuses SMD peuvent provoquer au niveau des cellules souches hématopoïétiques de l'apoptose et des dommages à l'ADN par stress oxydant. Néanmoins, le contenu précis en miARN de ces vésicules extracellulaires pourrait être déterminé par séquençage d'ARN de façon à identifier les acteurs responsables de cet effet pro-apoptotique et pro-oxydant des exosomes issues de cellules stromales SMD. De plus, les vésicules extracellulaires contiennent des protéines qui peuvent aussi être responsables de ces effets et une approche protéomique pourrait également être envisagée.

PARTIE II : Apport du microenvironnement médullaire dans l'établissement d'un modèle murin de xénogreffe de syndromes myélodysplasiques humains.

1) Introduction

Les investigations in vivo des syndromes myélodysplasiques sont cruciales pour comprendre et analyser les interactions bidirectionnelles entre le clone SMD pathologique et son microenvironnement médullaire. Les modèles in vivo ont l'avantage de mieux récapituler la physiologie du microenvironnement SMD humain et permettent une évaluation longitudinale des interactions entre l'hématopoïèse SMD et le microenvironnement médullaire. Cependant le développement de modèles murins de xénogreffe de syndromes myélodysplasiques reste difficile. Alors que certains types de leucémies aiguës myéloïdes permettent l'obtention de souris humanisées avec un fort taux de réussite et de chimérisme (144, 145), les SMD ne greffent pas ou bien à niveau faible qui, de plus est transitoire et inconstant. L'incapacité des cellules souches myélodysplasiques humaines de greffer et de reconstituer une hématopoïèse pathologique dans des souris fortement immunodéprimées suggère que ces cellules souches SMD doivent avoir besoin d'un support extrinsèque du microenvironnement pour potentialiser la maladie. Dans cette deuxième partie, nous détaillerons dans un premier temps les différents modèles de xénogreffes SMD ayant été réalisés dans une revue de la littérature. Dans un deuxième temps, nous présenterons les résultats obtenus avec notre modèle de xénogreffe.

2) Article revue de la littérature sur les modèles murins humanisés de syndrome myélodysplasique

Modèles murins de syndromes myélodysplasiques par xénogreffe

Murine xenografted models of myelodysplastic syndromes

Mathieu Meunier[1,2]
Sophie Park[1,2]

[1] Clinique universitaire d'hématologie
CHU de Grenoble, CS 10217
38043 Grenoble cedex 09
France
<mmeunier2@chu-grenoble.fr>
<spark@chu-grenoble.fr>

[2] TIMC-Therex (UMR 5525 CNRS)
Université Grenoble Alpes
Domaine de la Merci
38706 La Tronche Cedex
Grenoble
France

Remerciements et autres mentions :

Financement : aucun.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

RÉSUMÉ

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) correspondent à une pathologie clonale de la cellule-souche hématopoïétique (CSH). Il est possible de réaliser des souris dites humanisées en réalisant des xénogreffes de CSH provenant de patients SMD. Ces modèles représentent un formidable outil pour l'étude de la physiopathologie et pour l'élaboration de nouvelles molécules d'intérêt. Néanmoins, les résultats de prise de greffe restent faibles et aléatoires notamment pour les SMD de bas risque. Mais des avancées récentes dans la compréhension de la physiopathologie des SMD ont permis une amélioration des résultats de chimérisme.

● Mots clés : syndromes myélodysplasiques ; xénogreffe ; modèles animaux de maladie humaine.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes are a hematopoietic stem cell clonal disorder. It is possible to create humanised mice by xenografting hematopoietic stem cells from myelodysplastic patients. These humanised mice represent an outstanding tool for the study of physiopathology and the development of new drugs. Nevertheless, the data on engraftment are weak and unreliable, particularly for low-risk myelodysplastic syndromes. However, recent progress in the understanding of physiopathology has led to a significant improvement of data based on chimerism.

● *Key words: myelodysplastic syndromes; xenotransplantation; disease models; animal.*

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) représentent un groupe hétérogène de pathologies clonales de la cellule-souche hématopoïétique (CSH) [1, 2]. Ils touchent principalement les sujets âgés [3] et se caractérisent par une hématopoïèse inefficace aboutissant à des cytopénies sanguines (anémie la plus fréquente) contrastant avec une hypercellularité médullaire. Le terme « myélodysplasique » englobe toutes les anomalies morphologiques affectant la lignée myéloïde et représente le critère majeur du diagnostic des SMD. L'évolution de la maladie est marquée par la transformation vers la leucémie aiguë myéloïde dans 30 % des cas en raison de l'apparition progressive d'une instabilité génomique du système hématopoïétique [4, 5]. Les mutations les plus fréquentes présentes dans les SMD touchent les gènes du *spliceosome*, ceux qui modifient le statut de méthylation de l'ADN et de la chromatine [6, 7]. Le pronostic est déterminé par le score IPSS (*International prognosis scoring system*) permettant de classer les SMD en différents stades de gravité : bas risque et haut risque [8]. Néanmoins, la physiopathologie des syndromes myélodysplasiques reste encore incomprise d'où la nécessité d'avoir recours à des modèles *in vivo* pour mieux l'appréhender et avoir à disposition des modèles animaux reproduisant un SMD pour des essais thérapeutiques.

Il est possible de créer des modèles de souris transgéniques pouvant reproduire un SMD en influant sur

Tirés à part : M. Meunier

Pour citer cet article : Meunier M, Park S. Modèles murins de syndromes myélodysplasiques par xénogreffe. *Innov Ther Oncol* 2016 ; 2 : 49-52. doi : 10.1684/ito.2016.0019

doi: 10.1684/ito.2016.0019

la biogenèse des ribosomes (modèle NHD13 [9]), en surexprimant des facteurs de transcriptions (EVI1 [10], SALL4 [11]) ou en dérégulant des voies de signalisation intracellulaire (modèle BCL-2/NRASD12 [12]). Cependant, ces modèles ne reflètent pas l'hétérogénéité de la pathologie et ne sont pas le sujet de cette mise au point.

La majorité des modèles de xénogreffes de SMD sont réalisés sur des modèles murins : on parle de souris humanisées. Il faut noter que l'hématopoïèse murine présente quelques particularités par rapport à l'hématopoïèse humaine. Les globules rouges murins sont plus petits (5,5 *versus* 7-8 µm) [13], l'hématopoïèse extra-médullaire, notamment splénique, est toujours présente, la composition de la moelle osseuse est différente avec moins de granulocytes et plus d'érythrocytes, et des anomalies telles que l'anisocytose et la présence de corps Howell-Jolly, qui sont considérées comme pathologiques chez l'homme, ne le sont pas chez les souris [14, 15].

Par mutagenèse dirigée et croisement, il a été possible de créer différents types de souris immunodéprimées. Les premières souris utilisées pour les xénogreffes sont les souris SCID (*severe combined immunodeficiency*) [16]. Ces dernières présentent un trouble de la différentiation lymphocytaire T et B associée à une hypogammaglobulinémie. Cependant, l'immunité innée n'est pas touchée, ce qui entraîne un nombre important d'échecs de prise greffe en raison de l'activité des lymphocytes *natural killer* (NK). Puis sont apparues les souris NOD (*non-obese diabetic*)-SCID [17] qui, en plus de l'atteinte de l'immunité adaptative précédemment décrite, présentent une atteinte de l'immunité innée (déficit fonctionnel des NK, absence de complément circulant et atteinte de la différentiation des cellules présentatrices d'antigènes). Actuellement, les souris les plus utilisées dans les modèles de xénogreffes sont des NOD-SCID-IL2rg$^{-/-}$(NSG) [18]. Elles possèdent, à cause de la mutation de la chaîne γ du récepteur de l'interleukine 2, un profond déficit de l'immunité adaptative (absence de différenciation lymphocytaire B et T et absence de possibilité de leur activation) et de l'immunité innée avec impossibilité de générer des NK. En plus de l'immunodépression murine, il est généralement associé une irradiation corporelle totale allant de 2 à 4 Gy selon les équipes. Cette irradiation permet de détruire l'hématopoïèse murine résiduelle et de libérer la niche hématopoïétique au profit des cellules souches humaines.

Les premiers modèles de xénogreffes de SMD ont été réalisés *via* l'injection de CSH. Nilsson *et al.* [19] ont injecté par voie intraveineuse dans six souris NOS-SCID des cellules CD34$^+$/CD38$^-$ provenant de patients porteurs d'une délétion 5q. Une seule souris a greffé (12 %) et les cellules provenaient des patients porteurs d'une AREB1 (anémie réfractaire avec excès de blastes-1) de haut risque. Benito *et al.* [20] ont injecté en IV des cellules CD34$^+$ provenant de 61 patients porteurs d'un SMD à 61 souris NOD-SCID. Seulement 34 souris ont montré une prise de greffe avec un maximum de 10 %. Les souris provenant d'AREB en transformation, qui correspondent plus à une leucémie aiguë qu'à un SMD, présentaient le pourcentage de prise de greffe le plus important, soulignant ainsi la difficulté existante à réaliser des xénogreffes à partir d'échantillons provenant de SMD de bas risque. De plus, même s'il y a reconstitution d'une hématopoïèse humaine, cette dernière est incomplète. En effet, les xénogreffes réalisées à partir de sujets sains montrent initialement une prédominance de la lignée rouge qui s'efface au fur et à mesure au profit de la lignée lymphoïde B. Dans les modèles de xénogreffe SMD, c'est la lignée granuleuse qui prédomine [21]. De plus, dans la plupart des modèles SMD réalisés par xénogreffe, les souris ne meurent pas de symptômes correspondants à un SMD humain et le pourcentage de prise de greffe à partir d'un même échantillon est variable. Pour essayer de remédier à cela, Rhyasen *et al.* [22] ont développé un modèle de xénogreffes *via* une lignée cellulaire provenant d'un SMD de type anémie sidéroblastique à la phase non leucémique. Leur modèle montre une reproductibilité dans le développement de la maladie et dans la prise de greffe. Il y a cependant des limitations notables à utiliser un modèle de xénogreffe basé sur une seule lignée cellulaire pour extrapoler des maladies humaines et l'efficacité préclinique de nouvelles thérapeutiques.

« Le rôle du micro-environnement médullaire et notamment de la niche hématopoïétique dans la genèse des SMD est mis en exergue »

De plus en plus, le rôle du micro-environnement médullaire et notamment de la niche hématopoïétique dans la genèse des SMD est mis en exergue. Ce micro-environnement est composé d'ostéoblastes, adipocytes, cellules endothéliales, d'ostéoclastes provenant pour la plupart d'entre eux d'une même cellule progénitrice commune, la cellule-souche mésenchymateuse (MSC). On décrit classiquement deux entités au niveau de cette niche : une niche vasculaire et une niche endostéale [23, 24]. Une anomalie des composants de cette niche peut altérer l'hématopoïèse. En effet, Raaijmakers *et al.* [25] ont montré que l'invalidation de *Dicer1* dans les progéniteurs ostéoblastiques murins pouvait engendrer le développement d'un syndrome myélodysplasique avec évolution vers la leucémie aiguë. De même, Kode *et al.* [26] ont réussi à générer une véritable leucémie aiguë en induisant une mutation activatrice de la voie de la β-caténine dans des progéniteurs ostéoblastiques. Ces données sont en faveur d'un rôle essentiel du micro-environnement médullaire à la fois dans l'hématopoïèse normale et pathologique. Partant de ce concept, Kerbauy *et al.* [27] ont réalisé un modèle de xénogreffe en co-injectant en intra-médullaire un mélange de lignée cellulaire stromale (HS5 ou HS27a) et de CD34$^+$ provenant de six patients ayant un SMD dans 15 souris NOD-SCID-β2m^{null} avec une prise de greffe chez 11 souris (73 %).

Muguruma *et al.* [28] ont montré que la co-injection de $CD34^+$ et de MSC favorise la prise de greffe myélodysplasique aux dépends de l'hématopoïèse normale. Medyouf *et al.* [29] ont confirmé que les cellules souches mésenchymateuses sont essentielles pour la propagation des cellules souches myélodysplasique dans des modèles de xénogreffes orthotopiques, avec notamment une amélioration du chimérisme pour les SMD de bas risque. Les analyses moléculaires et cytogénétiques ont montré la présence des mêmes clones dysplasiques initialement présents chez les patients.

Ainsi, la co-injection de MSC avec les CSH permettrait d'améliorer la prise de greffe notamment pour les SMD de bas risque en recréant une niche hématopoïétique pathologique favorable, illustrant le rôle essentiel du stroma médullaire. Une autre avancée de l'ingénierie génétique permettrait d'améliorer les résultats de prise de greffe. Il s'agit d'un nouveau modèle de souris immunodéprimées qui sécrètent des cytokines humaines (interleukine 3, GM-CSF et *stem cell factor*) appelées NOD-SCID-IL2rg$^{-/-}$-SGM3 (NSGS) [30]. Le rationnel provient d'une étude de Wunderlich *et al.* [30] montrant une *cross*-réactivité limitée entre les cytokines murines et les récepteurs humains pouvant limiter la croissance des cellules souches murines. Medyouf *et al.* [29] ont rapporté l'obtention d'un meilleur chimérisme en comparant les résultats de prise de greffe entre quatre souris NSG et quatre souris NSGS injectées avec les mêmes échantillons humains. Actuellement, le meilleur modèle de souris humanisées correspondrait à une co-injection de CSH et de MSC dans des souris NSGS. Il faudrait développer ces modèles à grande échelle pour pouvoir réduire l'hétérogénéité de prise de greffe et les utiliser dans un objectif de *screening* thérapeutique. Des firmes pharmaceutiques s'y sont investies dans les modèles de tumeurs solides [31] qui sont plus simples que les modèles de SMD puisqu'il suffit d'injecter les cellules tumorales en sous-cutané.

En conclusion, le modèle des xénogreffes murines dans les SMD est encore loin d'être parfait, mais les dernières avancées mettent en valeur le rôle d'un microenvironnement humanisé pour une meilleure prise de greffe humaine dans ces souris. Les derniers modèles notamment reproduisent parfaitement le pattern de mutations clonales retrouvées chez les patients, même dans les SMD de bas risque. Une communication, lors du dernier congrès de l'*American Society of Hematology* (ASH) en 2015 [32], présente des résultats très encourageants de xénogreffe en utilisant un nouveau modèle de souris immunodéprimée chimérique (MISTRG) sécrétant des cytokines humaines (M-CSF, IL-3, GM-CSF, et TPO) avec reproduction du phénotype et du génotype des SMD ayant servi à réaliser la greffe, permettant de tester l'efficacité de molécules thérapeutiques comme les agents hypométhylants ou traitements ciblés. Cependant, il reste encore des progrès à faire pour pouvoir étudier les mécanismes de transformation des SMD de bas risque vers les SMD de haut risque.

Take home messages

- Les syndromes myélodysplasiques (SMD) représentent un groupe hétérogène de pathologies clonales de la cellule souche hématopoïétique (CSH) se caractérisant par une hématopoïèse inefficace aboutissant à des cytopénies sanguines SMD et marqués par la transformation vers la leucémie aiguë myéloïde.
- Il est possible de créer des modèles murins de SMD humaines en greffant des cellules souches hématopoïétiques dans des souris profondément immunodéprimées.
- Cette prise de greffe est améliorée par la co-injection de cellules souches mésenchymateuses humaines visant à recréer le micro-environnement médullaire humain.
- Par ailleurs, de nouveaux modèles de souris immunodéprimées sécrétant des cytokines humaines permettent d'améliorer le chimérisme.
- À l'heure actuelle, le meilleur modèle de xénogreffe SMD correspondrait à l'utilisation de souris sécrétant des cytokines humaines associée à la co-injection de cellules souches mésenchymateuses.

RÉFÉRENCES

1. Chung YJ, Choi CW, Slape C, Fry T, Aplan PD. Transplantation of a myelodysplastic syndrome by a long-term repopulating hematopoietic cell. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2008 ; 105 : 14088-93.

2. Nilsson L, Eden P, Olsson E, *et al.* The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q myelodysplastic syndromes. *Blood* 2007 ; 110 : 3005-14.

3. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer* 2007 ; 109 : 1536-42.

4. Kuramoto K, Ban S, Oda K, Tanaka H, Kimura A, Suzuki G. Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome cells. *Leukemia* 2002 ; 16 : 2253-8.

5. Mufti GJ. Emerging therapeutic and supportive care approaches for the myelodisplastic syndromes. *Rev Clinical Exp Hematol* 2004 ; 8 : E4.

6. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, *et al.* Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013 ; 122 : 3616-27.

7. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2014 ; 28 : 241-7.

8. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997 ; 89 : 2079-88.

9. Choi CW, Chung YJ, Slape C, Aplan PD. Impaired differentiation and apoptosis of hematopoietic precursors in a mouse model of myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2008 ; 93 : 1394-7.

10. Laricchia-Robbio L, Fazzina R, Li D, *et al.* Point mutations in two EVI1 Zn fingers abolish EVI1-GATA1 interaction and allow erythroid differentiation of murine bone marrow cells. *Mol Cell Biol* 2006 ; 26 : 7658-66.

11. Ma Y, Cui W, Yang J, *et al.* SALL4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice. *Blood* 2006 ; 108 : 2726-35.

12. Omidvar N, Kogan S, Beurlet S, *et al.* BCL-2 and mutant NRAS interact physically and functionally in a mouse model of progressive myelodysplasia. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 11657-6.

13. Thompson CB, Galli RL, Melaragno AJ, Valeri CR. A method for the separation of erythrocytes on the basis of size using counterflow centrifugation. *Am J Hematol* 1984 ; 17 : 177-83.

14. Lee BH. Murine model of hematopoietic disease: pathologic analysis and characterization. In : *Mouse models of human blood cancers*. New York : Springer, 2008. 45-80.

15. Sanderson JH, Phillips CE. *An atlas of laboratory animal in haematology*. New York : Oxford University Press, 1981.

16. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983 ; 301 : 527-30.

17. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, *et al.* Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 1995 ; 154 : 180-91.

18. Ohbo K, Suda T, Hashiyama M, *et al.* Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood* 1996 ; 87 : 956-67.

19. Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, Arvidsson I, *et al.* Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *Blood* 2000 ; 96 : 2012-21.

20. Benito AI, Bryant E, Loken MR, *et al.* NOD/SCID mice transplanted with marrow from patients with myelodysplastic syndrome (MDS) show long-term propagation of normal but not clonal human precursors. *Leuk Res* 2003 ; 27 : 425-36.

21. Thanopoulou E, Cashman J, Kakagianne T, Eaves A, Zoumbos N, Eaves C. Engraftment of NOD/SCID-beta2 microglobulin null mice with multilineage neoplastic cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2004 ; 103 : 4285-93.

22. Rhyasen GW, Wunderlich M, Tohyama K, Garcia-Manero G, Mulloy JC, Starczynowski DT. An MDS xenograft model utilizing a patient-derived cell line. *Leukemia* 2014 ; 28 : 1142-5.

23. Raaijmakers MH, Scadden DT. Evolving concepts on the microenvironmental niche for hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* 2008 ; 15 : 301-6.

24. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010 ; 466 : 829-34.

25. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, *et al.* Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 2010 ; 464 : 852-7.

26. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, *et al.* Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts. *Nature* 2014 ; 506 : 240-4.

27. Kerbauy DM, Lesnikov V, Torok-Storb B, Bryant E, Deeg HJ. Engraftment of distinct clonal MDS-derived hematopoietic precursors in NOD/SCID-beta2-microglobulin-deficient mice after intramedullary transplantation of hematopoietic and stromal cells. *Blood* 2004 ; 104 : 2202-3.

28. Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, *et al.* Establishment of a xenograft model of human myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2011 ; 96 : 543-51.

29. Medyouf H, Mossner M, Jann JC, *et al.* Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell Stem Cell* 2014 ; 14 : 824-37.

30. Wunderlich M, Chou FS, Link KA, *et al.* AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. *Leukemia* 2010 ; 24 : 1785-8.

31. Gao H, Korn JM, Ferretti S, *et al.* High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nat Med* 2015 ; 21 : 1318-25.

32. Song Y Taylor A, Rongvaux A, *et al. Efficient engraftment and disease replication of myelodysplastic syndromes using a novel humanized mice model*. 57th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2015: Abstract 4100.

Vous souhaitez recruter
un médecin pour compléter
votre équipe médicale ?

Pour une diffusion maximale de votre petite annonce

Contactez Corinne Salmon
01 46 73 06 63
corinne.salmon@jle.com

ou connectez-vous sur la rubrique
Petites annonces de notre site
www.jle.com

3) Article sur notre modèle de xénogreffe en cours de révision (Oncotarget)

RESEARCH ARTICLE

MOLECULAR DISSECTION OF ENGRAFTMENT IN A XENOGRAFT MODEL OF MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

Mathieu Meunier[1, 2*], Charles Dussiau[3*], Natacha Mauz[1, 2], Anne Sophie Alary [3], Christine Lefebvre[4], Gautier Szymanski[4], Mylène Pezet[5], Françoise Blanquet[6], Olivier Kosmider[3] and Sophie Park[1, 2]

[1] University Clinic of Hematology, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France;

[2] TIMC-Therex (UMR 5525 CNRS), Grenoble Alpes University, Grenoble, France;

[3] Hématologie Biologique, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), France ;

[4] Laboratory of hematology, Onco-genetic and immunology, Biology and Pathology Institute, Grenoble, France;

[5] U823, Plateforme de Microscopie Photonique - Cytométrie en Flux, Institut Albert Bonniot Site Santé BP170-38042, Grenoble, France ;

[6] PHTA (Plate-forme de Haute Technologie Animale) UMR5525, Grenoble Alpes University, Grenoble, France ;

* Authors contributed equally

Contact information for correspondance:

Meunier Mathieu, Clinique Universitaire d'Hématologie, CHU Grenoble Alpes

CS10217, 38043 Grenoble cedex 09 France

Tel: (33) 04 76 76 75 75; Fax: (33) 04 76 76 56 61

Email: mmeunier2@chu-grenoble.fr

Presented in part at the 23st Hematopoiesis oncogenesis club Annual Meeting, October 12-15 2016, Giens.

Conflict of interest: The authors declare no major conflict of interest.

Abstract: 250 words

Text: 3159 words

References: 21

Tables/figures: 1 table – **2** figures

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) are oligoclonal disorders of the hematopoietic stem cells (HSC). Recurrent gene mutations are involved in the MDS physiopathology along with the medullar microenvironment. To better study the heterogeneity of MDS, it is necessary to create patient derived xenograft (PDX).

We have reproduced a PDX model by xenografting HSC ($CD34^+$) and mesenchymal stromal cells (MSC) in NOD/SCID/IL2rγ$^{-/-}$ mice with primary samples from one RAEB2, two RAEB1 and one RARS patients harboring karyotype abnormalities and gene mutations. The average human chimerisms ranged from 59.7% to 0.0175% for the 4 patients. Secondary grafts (G2) were only performed for mice derived from the RAEB2 patient and the average human chimerism was 53.33%. G1 mice 1 and 2, and their derived G2 mice showed less than 20% of medullar blasts whereas mouse 3 and the resulting G2 mice transformed to AML. Clonal architecture was dissected in the different hematopoietic progenitors (HP) harvested from G1 and G2 mice. By direct Sanger sequencing, we found the 4 initial mutations in each HP subpopulation and those mutations had the same variant allele frequency in the $CD34^+$ $CD38^-$ HSC from G1 and G2 mice by next generation sequencing (NGS). Targeted NGS analysis done in HSC of mouse 3 did not show any additional driver gene mutations explaining the transformation to AML.

To conclude, we have generated a PDX mouse model that perfectly reproduces the MDS founder clone which is stable over time, allowing us to consider this system as a powerful tool to test therapeutic approaches.

KEY WORDS: Myelodysplastic syndrome, patient derived xenograft, bone marrow microenvironment, mesenchymal stromal cells, mutational hierarchy.

INTRODUCTION

Myelodysplastic syndromes (MDS) are oligoclonal disorders of the hematopoietic stem cells (HSC) and are propagated by rare human MDS propagating cells (1, 2). MDS comprise diverse phenotypes characterized by ineffective hematopoiesis leading to cytopenia, bone marrow dysplasia and transformation to acute myeloid leukemia in 30 to 40% of the cases (3).

Somatic mutations are common in MDS physiopathology and different functional groups are identified: splicing factors, epigenetic regulators, transcription factors and kinase signaling (4-7). Moreover, the medullar microenvironment especially represented by the mesenchymal stromal cells (MSC) is also implicated in the development and propagation of dysplastic hematopoiesis (8-10). Extensive data suggest that MDS MSC are functionally altered and harbored epigenetic alterations (11). To better study the heterogeneity of MDS and to develop new therapeutic drugs, it becomes necessary to create patient derived xenograft (PDX) mice models by engrafting $CD34^+$ cells from MDS patients. Recent studies demonstrated that intramedullary co-transplantation method with HSC and MSC could improve engraftment on MDS in xenograft models (12). Here, we describe an efficient PDX model by using primary $CD34^+$ and autologous MSC from MDS patients. This model is stable over generations of mice and allows us to decipher the mutational hierarchy amongst different populations of early progenitors generated in mice by longitudinal next generation sequencing. We will use this tool for new therapeutic approaches.

RESULTS

Engraftment of patient-derived myelodysplastic syndrome in NSG mice

We transplanted intramedullary $CD34^+$ cells with autologous mesenchymal stromal cells from bone marrow obtained from patients with MDS in NOD/SCID/IL2r$\gamma^{-/-}$ (NSG) mice with a ratio of 1/3 respectively for $CD34^+$ and MSC (12). Twenty-four hours prior to transplantation, mice received one busulfan injection intraperitoneally (25mg/kg). There were one refractory anemia with blast excess (RAEB) 2, two RAEB 1 and one refractory anemia with ring sideroblast (RARS) with karyotype abnormalities and recurrent gene mutations involved in MDS (characteristics are described in Table 1). **Each patient sample gave rise to three mice.** Six months after transplant, mice were euthanized **as already described in Medyouf et al's work (12). No mice showed earlier signs of the disease like loss of weight or nose and eye bleeding**. The bone marrow was investigated for human chimerism by flow cytometry based on human CD45, human CD33, human CD19 and murine CD45. The average human chimerisms (based on percentage of human CD45 positive cells) were respectively 59.7% (50.92 - 68.48); 0.23% (0.142 - 0.318); 0.13% (0.097 - 0.318) and 0.0175% (0.015 – 0.019) for the 4 patients (Figure 1A, 1B). As already described in previous studies, we have chosen a threshold of 0.01% of human cells to define a human engraftment in mice (13) and according to this threshold all the mice were engrafted. There was a clear myeloid bias in this human engraftment as we did not find any B positive cells.

We also determined if the human mesenchymal stromal cells injected with $CD34^+$ were still present at the end of the xenograft procedure. By flow cytometry and using a consensual panel of antibodies (CD90, CD73, CD105 and CD45) (14), we did not find any human MSC in mice bone marrow (data not shown) at 6 months of engraftment suggesting that MSC were essentially involved at the beginning of the engraftment process.

Secondary grafts were only performed for mice derived from patient 1 (RAEB2) and each mouse of the first generation gave rise to two mice for the second generation. These secondary grafts were performed by intra bone injection of $1x10^5$ $CD34^+$ cells without autologous MSC to assess the propagating capacity of the cells obtained after the first PDX. For the secondary graft, we hypothesized that the engraftment would be faster so we performed a tibia bone marrow aspiration to monitor the engraftment 3 months after injection and as human engraftment was already evidenced by this intermediate point, the mice were sacrificed at 3 months. The average human chimerism for the six mice of the second generation was 53.33% (36.61 - 70.05), not different from the chimerism obtained at the first engraftment (Figure 1C).

Molecular dissection of the bone marrow compartment of mice engrafted with myelodysplastic syndrome-originated cells.

Then, we focused on biological materials from patient 1 graft for all further experiments. First, morphological observations of bone marrow cytospins stained by May-Grünwald Giemsa (MGG) coloration of engrafted mice from first and second generations showed presence of human blasts and human neutrophils and characteristics features of dysplasia already described in the original patient sample (Figure 1D). Moreover, we have realized human blasts count on those cytospins. Interestingly, mice 1 and 2 showed less than 20% of medullar blasts and also for their derived 2^{nd} generation mice (10.6% (9.47 – 11.73)) whereas mouse 3 and the resulting secondary graft mice harbored more than 20% of medullary blasts (73.67% (65.98 – 81.35)) suggesting a more aggressive disease (figure 1E).

We performed FISH analyses of $CD34^+$ cells from the first generation of mice and found the same cytogenetic abnormality (del5q) in 87.5% of the $CD34^+$ cells harvested from the mice *versus* 79% in total bone marrow cells at diagnosis of the patient 1 (figure 1F).

We then isolated hematopoietic stem cells (HSCs), common myeloid progenitors (CMPs), granulocyte macrophage progenitors (GMPs) and megakaryocyte–erythroid progenitor (MEPs) by FACS cells sorting based on specific antigens (CD34, CD38, CD45RA and CD123) as already described (15) (figure 2A) from xenografted bone marrow from first and second generations of mice. We performed targeted sequencing for genes with initial mutations found in the patient 1 sample (KIT, SF3B1, TP53 and RUNX1) in all the progenitors by Sanger technique with specific primers. We found these initial mutations in all the different progenitors in 1^{st} and 2^{nd} generation of mice (Figure 2B). We performed also next generation sequencing (NGS) on a panel of 39 genes previously described and involved in MDS physiopathogenesis (16) in the HSC from the first-generation mice to check if the xenograft procedure could induce other mutations than specified in the initial sample of the patient 1, and in HSC derived from mouse 3 to analyze if the excess of blasts number, reflecting probably a more aggressive disease, was associated with new mutations. Concerning HSC, the variant allele frequencies (VAF) of initial mutations were similar between all the mice from the first generation and mice derived from mice 3 (45-50%) (Figure 2C). No new recurrent mutations were found to explain the higher blasts level of mice 3 and its derived mice. NGS was also performed on the initial mesenchymal stromal cells used during the xenograft procedure. Neither the four initial mutations nor other known recurrent mutation in MDS were found in these MSC. We found two polymorphisms, one well-known on *TP53* gene and another one on *STAG1* gene in both HSC and MSC, strongly suggesting their germinal origin.

Chemotherapy validation of the model

Furthermore, we validated our model by using a therapeutic approach with chemotherapy. Indeed, we have treated engrafted mice with intraperitoneally injection of cytarabine (10mg/kg) five days per week during two weeks at the third month post-transplant. The mice were killed one week after the end of cytarabine course. Bone marrow chimerism was analyzed as previously described. Mock treated mice show an average 75.65% (69.4 – 81.66) of human $CD45^+$ cells *versus* 22.67% (18.69 – 27.15) (p=0.0012) for mice treated with cytarabine (Figure 2D). We have also done cell sorting for the HSCs, CMPs, GMPs and MEPs in order to perform targeted sequencing for initial gene mutations. These mutations were found in all the progenitors, reflecting the fact that although cytarabine reduces human chimerism, all the mutated progenitors remain and will probably be the stem of future relapses.

DISCUSSION

We demonstrate here the possibility to make a PDX mouse model that perfectly reproduces the MDS founder clone. We chose to add MSC to $CD34^+$ at the first generation of mice as we believe as Medyouf et al (12), that a humanized microenvironment could improve engraftment of MDS $CD34^+$ cells. This method allowed us to get an engraftment success of 100% of our patients although the series is small. There is controversy about the beneficial effect on engraftment of adding mesenchymal stromal cells to $CD34^+$ cells (13). Muguruma et al have (17) achieved a successful engraftment of myelodysplastic syndrome by adding MSC to $CD34^+$ cells but the efficiency of the engraftment was related to the presence of an abnormality in chromosome 7. Li et al (18) obtained better chimerism by engrafting $CD34^+$ cell with a human marrow stroma cell line (HS27a). Those results were confirmed by Medyouf et al (12) with direct intrabone injection of $CD34^+$ cells and MSC. **Like Medyouf et al, we have also chosen some higher risk MDS patients with RAEB1 and RCMD with complex karyotype. Nevertheless patient 1 had a more aggressive disease.**

Recently, Rouault-Pierre et al (13) showed that co-injection of $CD34^+$ cells with MSC did not improve the level of engraftment in a cohort of 10 MDS samples. These data suggest that engraftment potential of the MDS $CD34^+$ did not depend on the presence of human MSC. Interestingly, in Medyouf's study, the secondary grafts were performed without adding MSC and cells successfully engrafted as we have found. We can hypothesize that MSC cells could improve the level of engraftment for primary graft, but for secondary graft, the propagation capacities of the sole cells are sufficient to engraft.

In one patient, all the mutations were present very early in the course of the disease in the HSC, CMP, MEP and GMP. This clone is very stable over time as it does not disappear in the second generation of mice and no new mutations were found neither. Recently, Belderbos et al (19) demonstrated in a xenograft model of lymphoblastic acute leukemia that serial

transplantation is leading to a clonal selection with a deterministic pattern. In our model, it seems that serial transplantation increases the potential of reconstitution of the LSC, as we transplanted a lower number of $CD34^+$ in the 2^{nd} generation of mice, but obtained an increased number of blasts in mouse 3, but this was not reflected by a clonal skewing or expansion in the sequential HSC sequencing in our MDS model.

The mutations were still present in the minimal residual disease after cytarabine too, confirming that traditional chemotherapy does not reach the leukemic stem cells and just reduces the bulk blasts. Therefore, we generated a PDX model of MDS where the clonal architecture was not altered. **This in vivo model represents an interesting tool to define therapeutic approaches in high-risk MDS models**.

MATERIALS AND METHODS

$CD34^+$ and mesenchymal stromal cells (MSC) selection from primary samples

Bone marrows from myelodysplastic patients were collected by bone marrow aspiration after signed consent and approval by our local ethical committee. By density gradient using Ficoll (Eurobio), the mononuclear cells were isolated from total bone marrow. HSPCs (hematopoietic stem progenitor cells) were positively selected by paramagnetic iron-dextran particles directly conjugated to anti-CD34 monoclonal antibodies (CD34 MicroBead Kit, human, Miltenyi Biotec) by using an automatized system (MACS pro, Miltenyi Biotec). Their viability was assessed by trypan blue exclusion (Sigma Aldrich). The purity of all samples was checked by flow cytometry (BD FACS Canto II, BD Biosciences) with a specific CD34 fluorochrome-conjugated antibody (CD34-APC, Miltenyi Biotec) and was superior to 90% for all samples used. The same procedure was used for $CD34^+$ cells sorting from xenografted mice bone marrow.

The CD34 negative fractions or total bone marrows from MDS patients were incubated in culture flask of $75cm^2$ (BD Falcon™) with DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Life technologies, Paisley, UK) plus Fetal serum bovine (ThermoFisher Scientific) at 10%, antibiotics (penicillin and streptomycin, Life technologies™) and L.glutamine at 1% (Glutamax, ThermoFisher Scientific) at 37°C. Mesenchymal stromal cells were isolated by adherence to plastic after multiple washes by phosphate buffering saline, and their phenotype was confirmed by flow cytometry (BD FACS Quanto II, BD Biosciences) using CD73 (CD73APC, Miltenyi Biotec), CD90 (CD90PE-CY™ 7, BD Biosciences), CD105 (CD105PE, Miltenyi Biotec) and CD45 (CD45V500, BD horizon™, BD Biosciences). All MSC were positive > 95% for CD73, CD90 and C105 and negative for CD45. Moreover, we have checked their ability for trilineage adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation, meeting the conventional criteria for MSC (20). **Osteoblastic, adipogenic and chondrogenic**

differentiation medium used were commercial solutions (StemMACS™ OsteoDiff Media, StemMACS™ AdipoDiff Media, StemMACS™ ChondroDiff Media, MACS, Miltenyi Biotec). Culture medium were replaced every 4 days for 21 days. Then osteogenic differentiation was evaluated by alkaline phosphatase staining (SIGMA FAST™ 5-Bromo-4-chloro-3-Indonyl phosphate, Sigma-Aldrich), adipogenic differentiation by staining with Oil Red O (Abcam®) and chondrogenic differentiation by sulfated proteoglycans staining with alcian blue (Leica Biosystems) (Supplemental data, figure 1). All the MSC used for the xenograft model were inferior to passage 5.

Xenotransplant Assays

NOD/SCID/IL2rγ$^{-/-}$ (NSG) mice were maintained in sterile isolator cages in the animal facility of the Grenoble Alpes University. NSG mice used in this study were 8 to 12 weeks old at the beginning of experiments. Twenty-four hours prior to transplantation, mice received one busulfan injection intraperitoneally (25mg/kg). Direct intra bone marrow injection was performed in the tibia with $5x10^5$ CD34$^+$ cells and $1.5x10^6$ MSC from the same patient. Prior to injection, CD34$^+$ cells were thawed. Secondary grafts were performed by intra bone injection of $1x10^5$ CD34$^+$ cells. **The mice were monitored everyday according to a specific wellness scoring. The mice were weighted every week and in case of bleeding or asthenia, a retro-orbital blood analysis was done. For the secondary graft, we hypothesized that the engraftment would be faster so we performed a tibia bone marrow aspiration to monitor the engraftment 3 months after injection.** All procedures were approved by the Animal care committee of Grenoble Alpes University (agreement number: B385161006)

285 ***Human chimerism and morphological analyses***

286 The mice were killed at the end of the xenograft procedure (6 months). Bone marrow
287 contents from tibiae, femora and humeri were collected. The human chimerism was
288 determinated using FACS flow (quanto II, BD) with the following antibodies human CD45
289 (CD45-Viogreen™, Miltenyi Biotec), murine CD45 (CD45 PeRCP-Vio700, Miltenyi Biotec),
290 human CD33 (CD33-PE, Miltenyi Biotec) and human CD19 (CD19-APC, Miltenyi Biotec).
291 As already described in previous studies, we have chosen a threshold of 0.01% of human cells
292 to define a human engraftment in mice (13). Aliquot of each bone marrow were stained with
293 May-Grunwald-Giemsa (MGG) by an automatized way (Aerospray®Pro, Elitech). Then, the
294 % of human's blasts were counted and the morphology of the cells was described by a trained
295 cytologist.

296

297 ***Fluorescence in situ hybridization***

298 For detection of the 5q deletion, FISH targeting the EGR1 gene was performed on
299 $CD34^+$ sorted cells and total bone marrow using a dual-color probe (Del(5q) deletion
300 Cytocell® : EGR1-Tx-Red/control probe 5p15-FITC). Briefly, slides were fixed in
301 methanol/acetic acid 3:1 for 30 minutes, air-dried, and dehydrated through graded alcohols.
302 Both FISH probes and target DNA were denatured simultaneously for 3 minutes at 75°C and
303 incubated for 20 hours at 37°C. The post hybridization washes were performed according to
304 the manufacturer's instructions (Cytocell®). Two hundred nuclei were scored.

305

306 ***Isolation of MPPs, MLPs, CMPs, GMPs and MEPs***

307 $CD34^+$ human cells obtained at the end of the xenograft procedure were stained with the
308 following antibodies: CD34 (CD34-APC, Miltenyi Biotec), CD123 (CD123-PerCP-CY5.5,

309 BD Bioscineces), CD45RA (CD45RA-FITC, IOTest®) and CD38 (CD38-PE, Miltenyi
310 Biotec). Hematopoietic stem cells (HSCs), common myeloid progenitors (CMPs), granulocyte
311 macrophage progenitors (GMPs) and megakaryocyte–erythroid progenitor (MEPs) were
312 isolated as already described (15). DAPI (Thermo Scientific) was added to the cell suspension
313 to exclude dead cells. Cells were sorted on a BD FACS Aria (San Jose, CA) operating
314 in 4 way purity sort mode, and collected into 5 ml polypropylene tubes. Then the cells
315 were washed in phosphate-buffered saline solution.

316

317 ***DNA isolation***

318 The method used for DNA isolation differed with the number of cells. For more than
319 100 000 cells, and between 100 000 and 10 000 cells, the QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN)
320 and the FlexiGene DNA Kit (QIAGEN) were used respectively following the manufacturer's
321 instruction. For less than 10 000 cells, cells were lysate with tween 20 and proteinase K.

322

323 ***Sanger and next generation sequencing***

324 A selected panel of 39 genes recurrently mutated in MDS was designed and mutations
325 were identified by next-generation sequencing (NGS) in BM mononuclear cells (MNCs)
326 using a PGM system (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) and the 384-reaction Ion
327 AmpliSeq library kit 2.0 (Life Technologies, Chicago, IL) Base calls were generated by the
328 Torrent Browser software (Life Technologies). The annotated .vcf files were also analyzed
329 using NextGENe software (Softgenetics, State College, PA, USA). Abnormalities identified
330 by both analyses were considered if referenced in UCSC and absent in 1000 genomes
331 databases. For a given mutation, the proportion of mutated cells was twice the VAF of

heterozygous mutations, or one-fold the VAF for homozygous mutations or hemizygous mutations of X chromosome genes in males) (21).

Statistics

The significance of the experimental results was determined with an unpaired Student test. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. All statistical analyses were done with GraphPad Prism 5 software (http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/). Data are mean with SEM.

AUTHOR CONTRIBUTIONS:

MM and CD contributed equally. MM, NM, MP, CL, GS and FB contributed to experiments and analysis. CD, OK and ASA contributed to sequencing and data analysis. MM, CD, OK and SP were involved with all aspects of the study's design and contributed to manuscript preparation.

ACKNOWLEDGMENTS

MM has received a financial grant from Université Grenoble Alpes (Programme AGIR 2014) and a grant "Espoir Sandrine".

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no major conflict of interest.

REFERENCES

1. Woll PS, Kjallquist U, Chowdhury O, Doolittle H, Wedge DC, Thongjuea S, et al. Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. Cancer Cell. 2014 Jun 16;25(6):794-808.
2. Mian SA, Rouault-Pierre K, Smith AE, Seidl T, Pizzitola I, Kizilors A, et al. SF3B1 mutant MDS-initiating cells may arise from the haematopoietic stem cell compartment. Nat Commun. 2015 Dec 08;6:10004.
3. Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. American journal of hematology. 2016 Jan;91(1):76-89.
4. Bejar R. Implications of molecular genetic diversity in myelodysplastic syndromes. Current opinion in hematology. 2017 Mar;24(2):73-8.
5. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. The New England journal of medicine. 2011 Oct 13;365(15):1384-95.
6. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature. 2011 Sep 11;478(7367):64-9.
7. Malcovati L, Galli A, Travaglino E, Ambaglio I, Rizzo E, Molteni E, et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. Blood. 2017 Jun 22;129(25):3371-8.
8. Muntion S, Ramos TL, Diez-Campelo M, Roson B, Sanchez-Abarca LI, Misiewicz-Krzeminska I, et al. Microvesicles from Mesenchymal Stromal Cells Are Involved in HPC-Microenvironment Crosstalk in Myelodysplastic Patients. PloS one. 2016;11(2):e0146722.
9. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. Nature. 2010 Apr 8;464(7290):852-7.
10. Zambetti NA, Ping Z, Chen S, Kenswil KJ, Mylona MA, Sanders MA, et al. Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. Cell Stem Cell. 2016 Nov 03;19(5):613-27.
11. Mhyre AJ, Marcondes AM, Spaulding EY, Deeg HJ. Stroma-dependent apoptosis in clonal hematopoietic precursors correlates with expression of PYCARD. Blood. 2009 Jan 15;113(3):649-58.
12. Medyouf H, Mossner M, Jann JC, Nolte F, Raffel S, Herrmann C, et al. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. Cell Stem Cell. 2014 Jun 05;14(6):824-37.
13. Rouault-Pierre K, Mian SA, Goulard M, Abarrategi A, Tullio AD, Smith AE, et al. Preclinical modeling of myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2017 Jun 02.

14. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.
15. Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002 Sep 03;99(18):11872-7.
16. Kosmider O, Passet M, Santini V, Platzbecker U, Andrieu V, Zini G, et al. Are somatic mutations predictive of response to erythropoiesis stimulating agents in lower risk myelodysplastic syndromes? Haematologica. 2016 Jul;101(7):e280-3.
17. Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, Yumino S, Tanaka Y, Miyachi H, et al. Establishment of a xenograft model of human myelodysplastic syndromes. Haematologica. 2011 Apr;96(4):543-51.
18. Li X, Marcondes AM, Ragoczy T, Telling A, Deeg HJ. Effect of intravenous coadministration of human stroma cell lines on engraftment of long-term repopulating clonal myelodysplastic syndrome cells in immunodeficient mice. Blood cancer journal. 2013 Apr 26;3:e113.
19. Belderbos ME, Koster T, Ausema B, Jacobs S, Sowdagar S, Zwart E, et al. Clonal selection and asymmetric distribution of human leukemia in murine xenografts revealed by cellular barcoding. Blood. 2017 Jun 15;129(24):3210-20.
20. Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. Cytotherapy. 2013 Sep;15(9):1054-61.
21. Chesnais V, Arcangeli ML, Delette C, Rousseau A, Guermouche H, Lefevre C, et al. Architectural and functional heterogeneity of hematopoietic stem/progenitor cells in non-del(5q) myelodysplastic syndromes. Blood. 2017 Jan 26;129(4):484-96.

FIGURES AND TABLES LEGENDS

Table 1: Table representing the principal biological characteristics of patients used for the xenograft model. RAEB: Refractory anemia with excess of blast; RARS: Refractory anemia with ring sideroblasts.

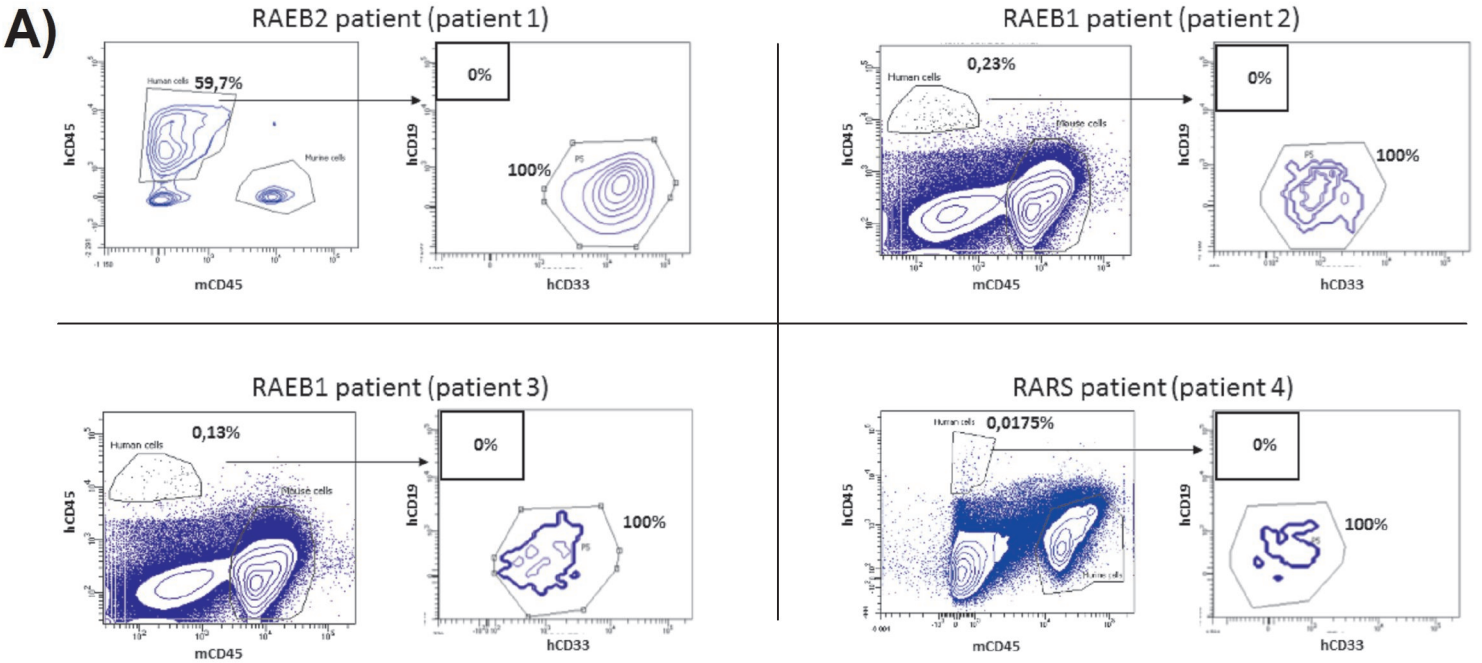
Figure 1: **A)** FACS plots showing the percentage of human cells at sacrifice (6 months after transplant) for the four patients engrafted. **B)** Scatter plot representing the percentage of human $CD45^+$ cells assessed by flow cytometry within the bone marrow retrieved from 1^{st} generation mice for each patient (6 months after transplant). **C)** Scatter plot representing the percentage of human $CD45^+$ cells assessed by flow cytometry within the bone marrow retrieved from 2^{nd} generation mice deriving from patient 1 (6 months after transplant). **D)** Picture of bone marrow cytospin stained by MGG (x40) from 1^{st} generation mouse of patient 1 showing the human blast infiltration and low granularity of granulocytic lineage. **E)** Flow chart representing the number of human blasts counted on bone marrow cytospin from each mouse of 1^{st} and 2^{nd} generations derived from patient 1 (6 months after transplant). **F)** FISH detection of del 5q. Nucleus is stained in blue (DAPI), del5q probe in red and control probe in green (x63). Experiment done on total bone marrow from patient 1 at diagnosis and on $CD34^+$ sorted cells from one mouse of 1^{st} generation (6 months after transplant).

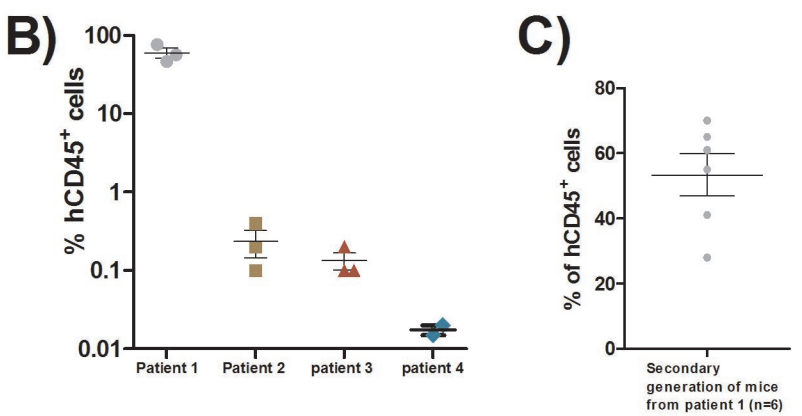
Figure 2: A) FACS plots showing the method used for hematopoietic progenitors sorting from xenografted bone marrow. Hematopoietic stem cells (HSC) are $CD34^+/CD38^-$, common myeloid progenitors (CMP) are $CD34^+/CD38^+/CD123^+/CD45RA^-$, granulocyte macrophage progenitors (GMP) are $CD34^+/CD38^+/CD123^+/CD45RA+$, and megakaryocyte–erythroid progenitors (MEP) are $CD34^+/CD38^+/CD123^-/CD45RA^-$. **Human cells were previously sorted with human $CD34^+$ magnetic beads. B)** Flow chart describing the presence of the

different gene mutations in each kind of human progenitors sorted from the bone marrow of the different generations of mice derived from patient 1. **C)** Table representing the different variant allele frequency obtained by next generation sequencing on hematopoietic stem cells (HSC) and mesenchymal stromal cells (MSC) from patient 1 xenografted mice. The brown rectangle represents the somatic mutations and the grey one polymorphisms. **D)** Scatter plot representing the effect of cytarabine on the percentage of human $CD45^+$ cells assessed by flow cytometry within the bone marrow retrieved from xenografted mice deriving from patient 1. Two groups, one with mice treated with cytarabine intraperitoneally (10mg/kg) 5 days/7 during two weeks and another group with mock treated mice.

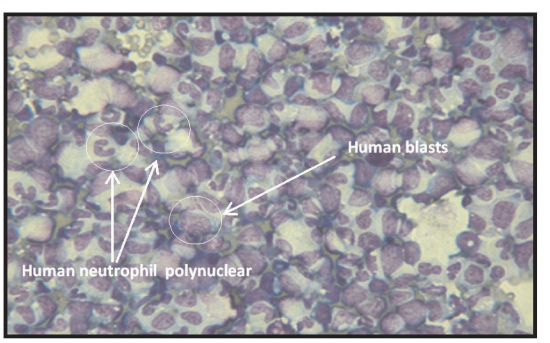
	MDS	Percentage of medullary blasts at diagnostis	Karyotype	Molecular biology
patient 1	RAEB-2	14	46,XY,del(5)(q13q34)[11]/ 46,sl,add(18)(q21)[9]	TP53 (G245D), SF3B1(R625H), RUNX1 (R201Q) and KIT (D816V)
patient 2	RAEB-1	4	44-45,XY,add(3)(p12),-7,add(17)(p12),mar,min[2] / 46,XY[18]	TP53 (G245D)
patient 3	RAEB-1	6	45,X,-Y,del(11)(q21q25)[1]/ 45,sl,ins(4;3)(q2?6;q28q24)[2]/ 90,idemx2[1]/ 45,sdl1,dic(11;?)(q13;?)[12] / 45,sl,t(6;12)(q25;q12),add(11)(q13)[4]/ 46,XY[2].ish ins(4;3)(EVI1+)	TET2 (R1216X)
patient 4	RARS	1,5	46,XX[20]	SF3B1 (K666R)

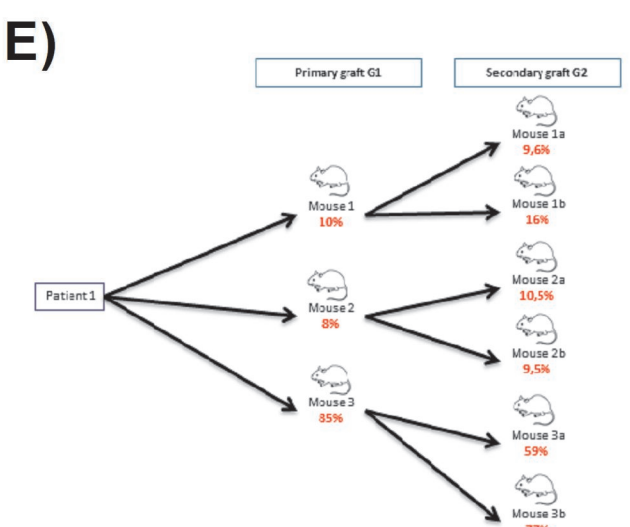
Figure 1


A)
RAEB2 patient (patient 1)
Human cells 59,7%
Murine cells
mCD45
hCD45
0%
100%
hCD19
hCD33
RAEB1 patient (patient 2)
0,23%
Human cells
Mouse cells
mCD45
hCD45
0%
100%
hCD19
hCD33
RAEB1 patient (patient 3)
0,13%
Human cells
Mouse cells
mCD45
hCD45
0%
100%
hCD19
hCD33
RARS patient (patient 4)
0,0175%
Human cells
mCD45
hCD45
0%
100%
hCD19
hCD33


B)
% hCD45+ cells
100
10
1
0.1
0.01
Patient 1
Patient 2
patient 3
patient 4

C)
% of hCD45+ cells
80
60
40
20
0
Secondary generation of mice from patient 1 (n=6)


D)
Human blasts
Human neutrophil polynuclear


E)
Primary graft G1
Secondary graft G2
Patient 1
Mouse 1
10%
Mouse 2
8%
Mouse 3
85%
Mouse 1a
9,6%
Mouse 1b
16%
Mouse 2a
10,5%
Mouse 2b
9,5%
Mouse 3a
59%
Mouse 3b
77%

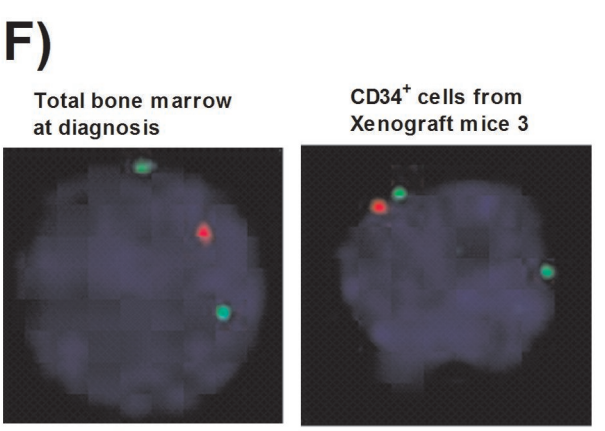
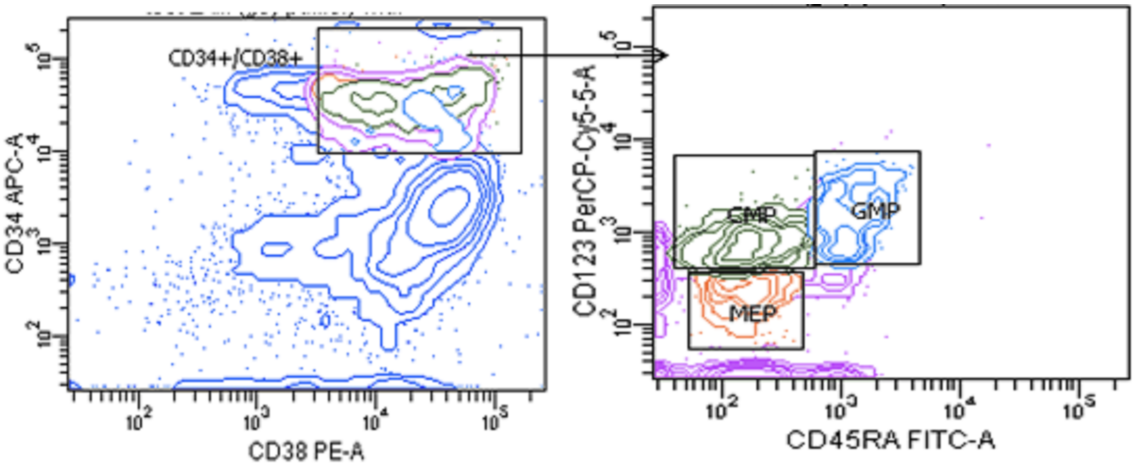
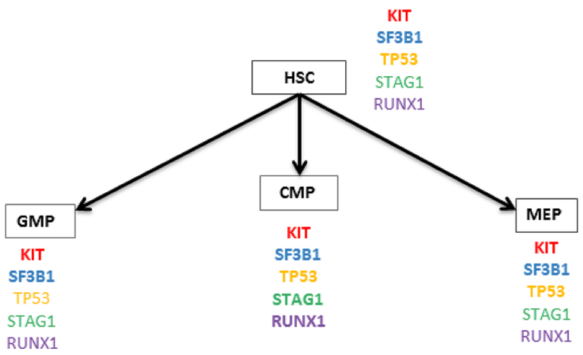

F)
Total bone marrow at diagnosis
CD34+ cells from Xenograft mice 3

Figure 2

A)



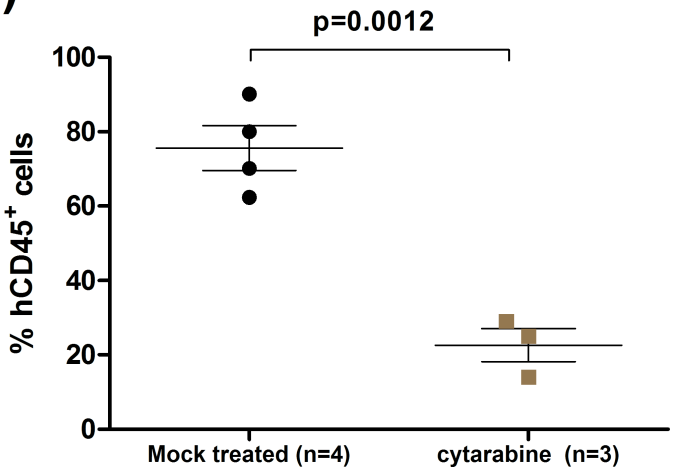
B)



C)

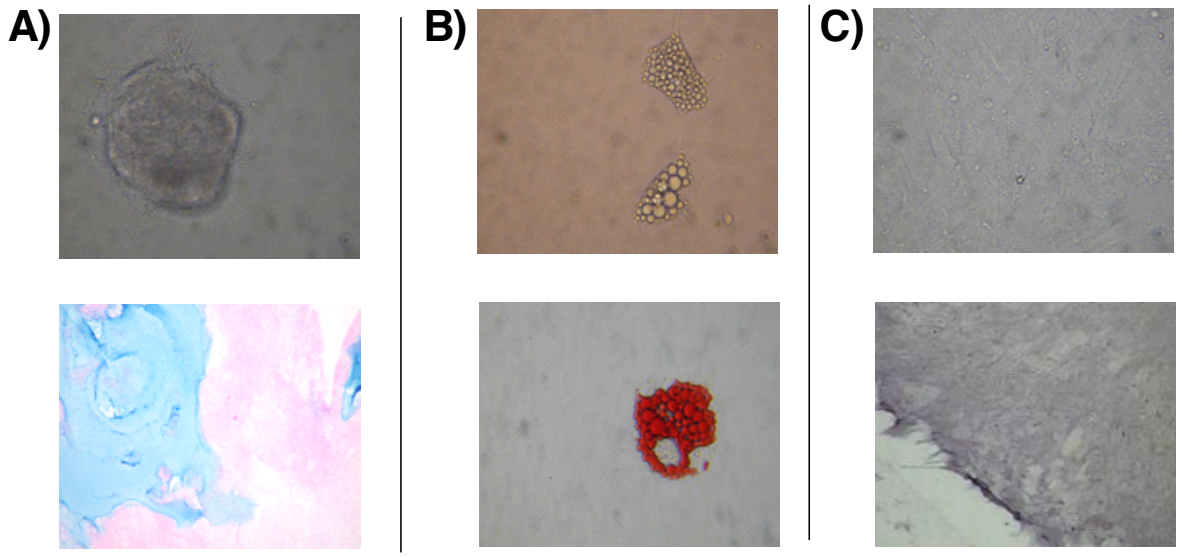
Variant allele frequency (%)	MSC	HSC1	HSC2	HSC3	HSC3a	HSC3b
KIT D816V	<3	49,5	50,08	52,93	50,34	51,94
SF3B1 R625H	<3	50,44	54,72	46,63	53,39	51,54
TP53 G245D	<3	99,74	100	100	99,45	99,48
RUNX1 R201Q	<3	47,76	41,34	50,12	41,83	56,66
STAG1 N670S	50,35	48,82	51,9	49,48	43,27	50,41
TP53 P72R	51,08	98,81	99,52	97,87	98,21	98,55

D)



SUPPLEMENTARY DATA

Sup Fig 1. Results confirming the ability for trilineage differentiation of mesenchymal stromal cells (adipogenic, osteogenic and chondrogenic):



A) Chondrocyte before and after alcian blue staining, X400. **B)** Adipocyte before and after red oil staining, X400. **C)** Osteocyte before and after alkaline phosphatase staining, X40. All the methods are described in the manuscript.

3) Conclusion et perspective

Ce modèle de xénogreffe représente un formidable outil pour tester de nouvelles molécules d'intérêt. Nous avons débuté un projet visant à étudier les effets du Luspatercept.

L'anémie représente la complication majeure des SMD de faible risque. L'enjeu de la prise en charge des SMD de bas risque est de diminuer les besoins transfusionnels de façon à éviter les complications liées à la surcharge martiale. De nouvelles molécules impliquées dans la signalisation du TGF-β sont en cours d'évaluation avec des résultats prometteurs. En effet, la voie du TGF- β est activée dans les syndromes myélodysplasiques, aboutissant à une apoptose accrue des progéniteurs myéloïdes et érythroïdes. Le Luspatercept (RAP-536) est une molécule piégeant les ligands du récepteur du TGF- β (activin B, GDF-11 et GDF-8 notamment) bloquant ainsi son activation.

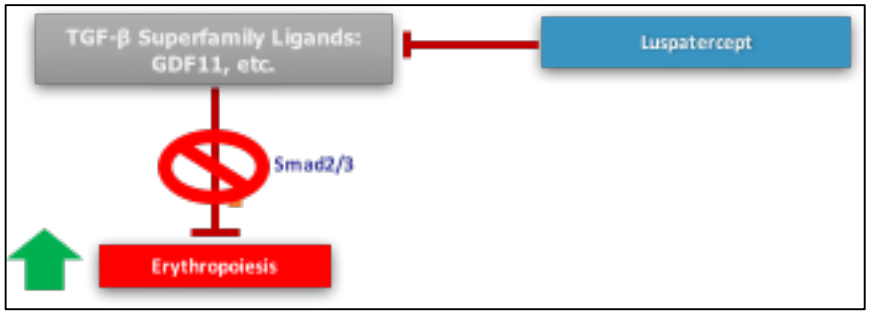


Figure 10: Mécanisme d'action du Luspatercept d'après Suragani (146)

Le Luspatercept a montré un effet positif sur l'érythropoïèse in vivo avec l'obtention dans 40% des cas d'une indépendance transfusionnelle et 70% d'amélioration érythroïde dans des études de phases II. Actuellement, le Luspatercept fait l'objet d'une étude de phase III dans les SMD notamment dans les anémies réfractaires sidéroblastiques (type particulier de SMD marqué par la présence d'une mutation SF3B1) ayant perdu la réponse aux agents stimulants de l'érythropoïèse. Actuellement, il n'y a pas de données scientifiques de l'impact du RAP-536 sur l'évolution des clones portant une mutation SF3B1.

Dans ce projet, nous utiliserons notre modèle de xénogreffe de syndromes myélodysplasiques pour analyser l'action du RAP-536 sur l'évolution clonale de l'hématopoïèse myélodysplasique SF3B1 positive, sur la prise de greffe et l'érythropoïèse et sur l'évolution des taux plasmatiques de GDF-11 et activin B.

PARTIE III: Rôle du stress oxydatif sur l'érythropoïèse dans les SMD

1) Introduction

Comme décrit précédemment, le fer libre en excès est toxique pour les cellules dès lors que les systèmes antioxydants sont dépassés. Or, les syndromes myélodysplasiques correspondent à une situation pathologique où l'excès de fer est fréquent du fait d'une part, de la dysérythropoïèse responsable d'un excès de fer endogène et d'autre part, via un apport massif exogène résultant du support transfusionnel des patients. Par ailleurs, de nombreuses études mettent en évidence un rôle du stress oxydatif généré par les ROS responsables de dommages à l'ADN et engendrant une instabilité génomique (147-149). Kikushi et al. (150) ont analysé de façon prospective les niveaux de 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) dans les cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) de patients SMD avant et après l'administration de déférasirox (DFX). Ils ont montré que les taux de 8-OHdG chez les patients SMD étaient significativement plus élevés que chez les volontaires sains et étaient positivement corrélés avec des anomalies chromosomiques. Les taux de 8-OHdG dans les PBMC des patients SMD diminuent significativement après administration de DFX suggérant que la chélation du fer réduit les dommages oxydatifs de l'ADN. Ainsi, l'excès de fer pourrait contribuer à la physiopathologie du SMD et la chélation du fer pourrait améliorer les dommages oxydatifs de l'ADN chez les patients SMD.

Dans cette dernière partie, nous étudierons quels peuvent être les effets potentiellement bénéfiques d'un chélateur de fer (déférasirox) sur l'érythropoïèse myélodysplasique dans un modèle de différentiation érythroïde avec surcharge martiale.

2) Article publié (**Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 62), pages : 105510-105524)**

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 62), pp: 105510-105524

Research Paper

Reactive oxygen species levels control NF-κB activation by low dose deferasirox in erythroid progenitors of low risk myelodysplastic syndromes

Mathieu Meunier[1,2], Sarah Ancelet[2], Christine Lefebvre[3], Josiane Arnaud[4], Catherine Garrel[4], Mylène Pezet[5], Yan Wang[2], Patrice Faure[4], Gautier Szymanski[3], Nicolas Duployez[6], Claude Preudhomme[6], Denis Biard[7], Benoit Polack[2,3], Jean-Yves Cahn[1,2], Jean Marc Moulis[8,9,10] and Sophie Park[1,2]

[1]CHU Grenoble Alpes, University Clinic of Hematology, Grenoble, France

[2]Université Grenoble Alpes, CNRS UMR 5525, Grenoble INP, CHU Grenoble Alpes, TIMC-IMAG ThEREx, Grenoble, France

[3]Laboratory of Hematology, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France

[4]Unité de Biochimie Hormonale et Nutritionnelle, Département de Biologie - Toxicologie - Pharmacologie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France

[5]Plateforme de Microscopie Photonique - Cytométrie en Flux, Institut Albert Bonniot, La Tronche, France

[6]Laboratory of Hematology and Tumor Bank, INSERM UMR-S 1172, Cancer Research Institute of Lille, CHRU of Lille, University Lille Nord de France, Lille, France

[7]CEA, Institut de Biologie François Jacob, SEPIA, Team Cellular Engineering and Human Syndromes, Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France

[8]Université Grenoble Alpes, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics, and Environmental and Systems Biology, Grenoble, France

[9]INSERM U1055, Grenoble, France

[10]CEA-Grenoble, Bioscience and Biotechnology Institute, Grenoble, France

Correspondence to: *Mathieu Meunier,* ***email:*** *mmeunier2@chu-grenoble.fr*

Keywords: *myelodysplastic syndromes; deferasirox; iron chelation; erythropoiesis; oxidative stress*

Received: *July 21, 2017* ***Accepted:*** *August 26, 2017* ***Published:*** *November 06, 2017*

Copyright: Meunier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Anemia is a frequent cytopenia in myelodysplastic syndromes (MDS) and most patients require red blood cell transfusion resulting in iron overload (IO). Deferasirox (DFX) has become the standard treatment of IO in MDS and it displays positive effects on erythropoiesis. In low risk MDS samples, mechanisms improving erythropoiesis after DFX treatment remain unclear. Herein, we addressed this question by using liquid cultures with iron overload of erythroid precursors treated with low dose of DFX (3μM), which corresponds to DFX 5 mg/kg/day, an unusual dose used for iron chelation. We highlight a decreased apoptosis rate and an increased proportion of cycling cells, both leading to higher proliferation rates. The iron chelation properties of low dose DFX failed to activate the Iron Regulatory Proteins and to support iron depletion, but low dose DFX dampers intracellular reactive oxygen species. Furthermore low concentrations of DFX activate the NF-κB pathway in erythroid precursors triggering anti-apoptotic and anti-inflammatory signals. Establishing stable gene silencing of the Thioredoxin (TRX) 1 genes, a NF-κB modulator, showed that fine-tuning of reactive oxygen species (ROS) levels regulates NF-κB. These results justify a clinical trial proposing low dose DFX in MDS patients refractory to erythropoiesis stimulating agents.

INTRODUCTION

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a rare group of heterogeneous clonal stem cell disorders characterized by dysplasia on myeloid cell lines leading to ineffective hematopoiesis and evolution to acute myeloid leukemia [1]. Low-risk MDS (low or intermediate-1 risk from international prognostic scoring system IPSS [2] and recently IPSSR [3] are characterized by increased intramedullary apoptosis of hematopoietic progenitors leading to inefficient hematopoiesis and cytopenia [4, 5].

Anemia is the most frequent cytopenia in MDS and most patients require red blood cell (RBC) transfusion resulting in the development of iron overload (IO). IO is a common complication of MDS management, decreasing life expectancy due to cardiac and liver failure [6]. As a consequence, most patients become transfusion-dependent and have to be treated with iron chelation therapy (ICT) such as deferoxamine, a classical iron-chelating agent which has to be administered intravenously. Deferasirox (DFX) with its high lipophilic property and oral administration has become a standard for IO treatment [7, 8]. The standard dose is ranging from 20 to 30 mg/kg/day. Many studies have shown the efficiency of DFX to decrease iron burden in lower risk MDS patients under red blood cell transfusion programs [9, 10]. Interestingly, ICT with DFX seems to have positive effects on hematopoiesis in some MDS patients leading to reduction of RBC transfusion or even transfusion independence [11–20].

In this study, we bring insight on an original effect of DFX in iron-overloaded condition. Strikingly, low dose DFX improves erythropoiesis *in vitro*, through reduction of ROS levels and activation of NF-κB. We demonstrate that ROS levels finely regulate the activation of NF-κB in the implemented cellular model.

RESULTS

Low dose of deferasirox has a beneficial effect on proliferation rates

A total of 27 low risk MDS samples were analyzed (more details are given in Table 1). Because of the varying initial proportion of $CD34^+$ cells and the inherent heterogeneity of proliferation capacities for each myelodysplastic samples, proliferation rates were given as a proliferation ratio (PR) consisting in the number of cells counted at each day of analysis divided by the initial number of $CD34^+$. In a set of preliminary experiments, we tested various DFX doses, ranging from 1, 3, 5, 7.5, 10 and 20μM onto hematopoietic stem progenitor cells (HSPCs) stemming from 3 MDS samples. It is noteworthy that 20μM corresponds to the plasma level of patients receiving 20 mg/kg/day of DFX for iron chelation use. Our results indicated that above 7.5μM DFX, there were no positive effects on cell proliferation in erythroid progenitors of MDS samples (data not shown). Consequently, all further experiments were carried out with 3μM DFX, corresponding to an oral dose of 5 mg/kg/day in patients, which will be called low dose (LD) DFX throughout the text.

For control condition (CTRL) and LD DFX respectively, PR were 27.6 (2.1-134.4) and 51.3 (3-440.7) (p=0.19) at D10 of erythroid differentiation, and 49.2 (3.2-207.9) and 82.2 (5.6-229.8) (p=0.039) at D14 (Figure 1A). These results showed an increased proliferation rate of erythroid progenitors derived from MDS samples 14 days after LD DFX treatment as compared to CTRL. Importantly, LD DFX did not affect the proliferation rate of HSPCs from healthy donors (n=5) which strongly suggests a specific role of LD DFX on MDS samples only (Supplementary Figure 1). We also sought to determine whether these proliferation-enhancing effects were specific to the chelating function of DFX. For that, we have tested two other iron chelators routinely used in clinical practice, desferoxamine (DFO) and deferiprone (DFP). In order to determine the concentrations of DFO and DFP which trigger similar iron chelating effects as LD DFX, we measured the total iron concentration in leukemia K562 cells by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) (data not shown). We then transposed those concentrations in the erythroid differentiation model, and impaired cell proliferation after either DFO or DFP treatment was observed as compared to the control conditions (Figure 1B), in contrast to the LD DFX effect. These expected results with DFO or DFP confirmed previously observed iron withdrawal effects on cell proliferation [21]. Altogether, these results demonstrate that LD DFX stimulates cell proliferation of MDS erythroid progenitors independently of iron removal.

Increased proliferation rates with LD DFX are due to a larger proportion of cycling cells, less apoptosis but no effects on erythroid differentiation

LD DFX entailed fewer apoptotic cells as compared to control, at D10 (n=7), with 13.8% (0.7-35.9) *versus* 17.5% (1.1-39.8%) (p=0.03) respectively, and at D14 (n=9) with 19.1% (1.2-70) *versus* 24.7% (2.7-81) (p=0.007) respectively (Figure 1C). Besides, we also observed more cycling cells with LD DFX at D10 (n=7) with 30.5% of S-G2-M cells (19-34.5) for DFX *versus* 21.9% (11.8-29.1) for CTRL (p=0.0001) (Figure 1D). At D14, there was no more statistical difference (data not shown).

The clonogenic properties were probed on 10 different MDS samples (Figure 1E). We observed an increased number of CFU-E colonies with DFX *versus* CTRL with on average 72.7 (15-261) and 46.5 (3-174.5)

Table 1: Samples characteristics

Patient	Date of birth	Diagnosis	Karyotype	IPSS-R
Patient 1	27/04/1926	RCMD	46, XY (20)	**low**
Patient 2	18/08/1934	RCMD	46, XY (20)	**low**
Patient 3	01/04/1941	CMML	45,X,-Y,del(13)(q12q21)[17]/45,sl,del(7)(q21q35)[3]	**high**
Patient 4	19/08/1938	RCMD	46, XX (20)	**low**
Patient 5	24/06/1957	RCMD	46, XY (20)	**low**
Patient 6	02/05/1951	RCMD	46, XY (20)	**low**
Patient 7	16/02/1947	ICUS	46, XX (20)	**low**
Patient 8	10/10/1955	RCMD	46, XX (20)	**low**
Patient 9	09/09/1932	RCMD	46, XX (20)	**low**
Patient 10	14/04/1959	RCMD	46, XX (20)	**low**
Patient 11	10/04/1953	RCMD	46, XY (20)	**low**
Patient 12	25/01/1928	RCMD	46, XY (20)	**intermediate**
Patient 13	28/02/1941	CMML	46, XY (20)	**low**
Patient 14	03/11/1947	RCMD	46, XY (20)	**low**
Patient 15	09/07/1936	RCMD	46, XX (20)	**low**
Patient 16	23/12/1968	RN	46, XY (20)	**low**
Patient 17	22/10/1939	RCMD	46, XX (20)	**low**
Patient 18	26/04/1933	RCMD	46, XY (20)	**low**
Patient 19	07/06/1940	RCMD	46, XY (20)	**low**
Patient 20	16/08/1924	ICUS	46, XX (20)	**low**
Patient 21	15/09/1935	RCMD	46, XX (20)	**low**
Patient 22	28/06/1925	CMML	46, XX (20)	**low**
Patient 23	15/11/1951	CMML	46, XX (20)	**low**
Patient 24	28/02/1941	CMML	46, XY (20)	**low**
Patient 25	31/07/1945	CMML	46, XY (20)	**low**
Patient 26	10/06/1973	RN	46, XY (20)	**low**
Patient 27	13/02/1935	CMML	46,XY,del(16)(q12q23)[10]/46,sl,del(9)(q13q33)[3]/46,sl,+del(16)(q12q23)[1]/	**high**

Diagnosis: CMML: chronic myelo-monocytic leukemia; ICUS: idiopathic cytopenia of undetermined significance; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RN: refractory neutropenia.

colonies respectively (p=0.04). However, no significant differences were detected for BFU-E, between DFX and CTRL: 59 (23-192.5) *versus* 44.3 (3-179) (p=0.14). It was noteworthy that LD DFX did not accelerate the different steps of erythroid differentiation (Supplementary Figure 2).

Induction of the NF-κB pathway by LD DFX

We then investigated which signaling pathways could be involved in the functional effects observed after DFX treatment. As evidenced by flow cytometry analysis, fluorescence intensities of either pAKT (Ser473), pS6 ribosomal protein (Ser235/236) or pERK (p44/42 MAPK) in 3 MDS samples treated with DFX (3μM) were not enhanced as compared to mock treated cells (data not shown). We then probed two major transcription factors required for hematopoiesis and tumorigenesis: NF-κB (nuclear factor-kappa B) and FOXO3a (a member of the Forkhead box O). We failed to detect any change of location of FOXO3a by confocal microscopy as compared

to mock treated cells (data not shown) (n=3). Regarding NF-κB nuclear recruitment after LD DFX treatment, we observed an increased NF-κB nuclear translocation (n=7) with an average fold of 1.69 (1.21-2.05) (p=0.004), which could correspond to an enhanced activation of the NF-κB pathway (Figure 2A).

We then analyzed 84 target genes belonging to the NF-κB pathway by RT-qPCR microarray plates on five samples (D14) treated or not with LD DFX. Four genes were over-expressed with LD DFX with a fold change > 2 and ten genes were down regulated (Figure 2B). Collectively, these results suggest enhanced anti-apoptotic (BIRC3, CSF3 and FASLG) and anti-inflammatory responses (TLR9, TLR4, LTBR, and TRAF2) as a result of the downstream NF-κB activation.

Moreover, we attempted to determine which of clonal or normal hematopoiesis could be amplified by LD DFX. To identify the molecular pattern of cells after

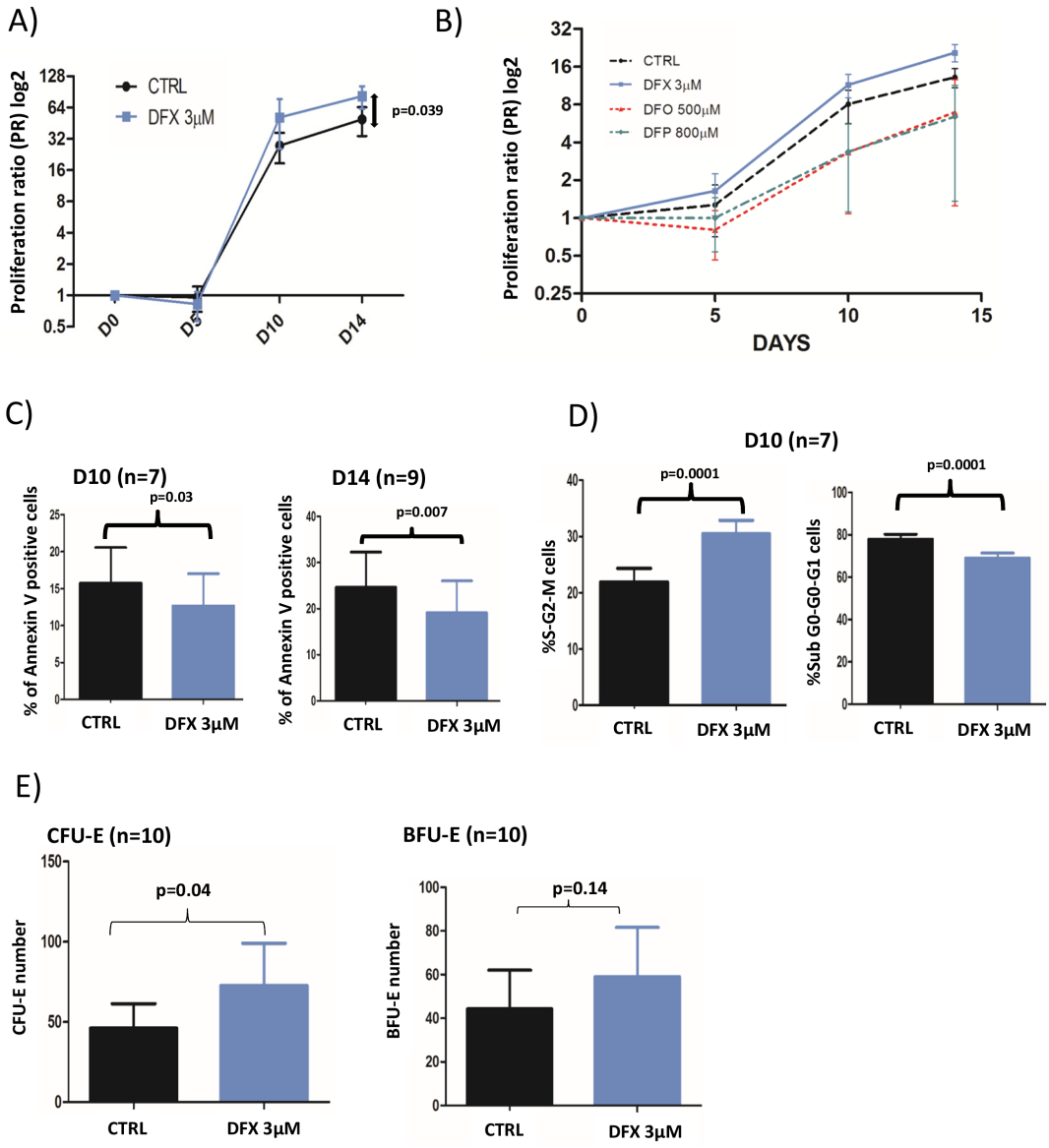


Figure 1: **(A)** Cell proliferation rates with or without 3 µM DFX (n=18). Proliferation rates were given as a proliferation ratio (PR) consisting in the number of cells counted at each day of analysis divided by the initial number of $CD34^+$. $CD34^+$ from myelodysplastic patients cells treated with DFX 3µM had a better proliferation rates (p=0.039) at the end of the cell culture period (day 14). **(B)** Proliferation rates after DFX (3µM) treatment in comparison with deferoxamine (DFO; 500µM) or deferiprone (DFP; 800µM) for 3 samples of $CD34^+$ from myelodysplastic patients. **(C)** Results of apoptosis assay (% of annexin V positive cells) assessed by flow cytometry using annexin V staining. **(D)** Cell cycle was analyzed by flow cytometry with DAPI staining (n=7) and the two histograms correspond to cells in mitosis and S-phase (left) or in other phases of the cycle (right). **(E)** Clonogenic assays were started at D5 (n=9) of the erythroid differentiation model. BFU-E: Burst Forming Unit-Erythroid; CFU-E: Colony Forming-Unit-Erythroid.

DFX treatment, we applied the erythroid differentiation model to 2 patients, one harboring mutation in the IDH1 (Isocitrate Dehydrogenase 1) gene, and the second in the MPL (MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor) and the SRSF2 (Serine and arginine Rich Splicing Factor 2) genes. The evolution of the variant allele frequency (VAF) was followed by Next Generation Sequencing (NGS) after different times of treatment (Supplementary Figure 3). Interestingly, we saw a slight decrease of the VAF at the end of the culture period for cells treated with DFX strengthening the notion that DFX could maintain a normal hematopoiesis.

DFX functional effects are independent of functional iron depletion

Since the functional effects of DFX are usually assigned to its iron chelating properties, intracellular iron concentrations were measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) after treatment of K562 cells with increasing doses of DFX for 48 hours (n=4). There was a dose-dependent decrease of intracellular iron with DFX reaching statistical significance (p=0.04) starting from 3 µM and above (Figure 3A).

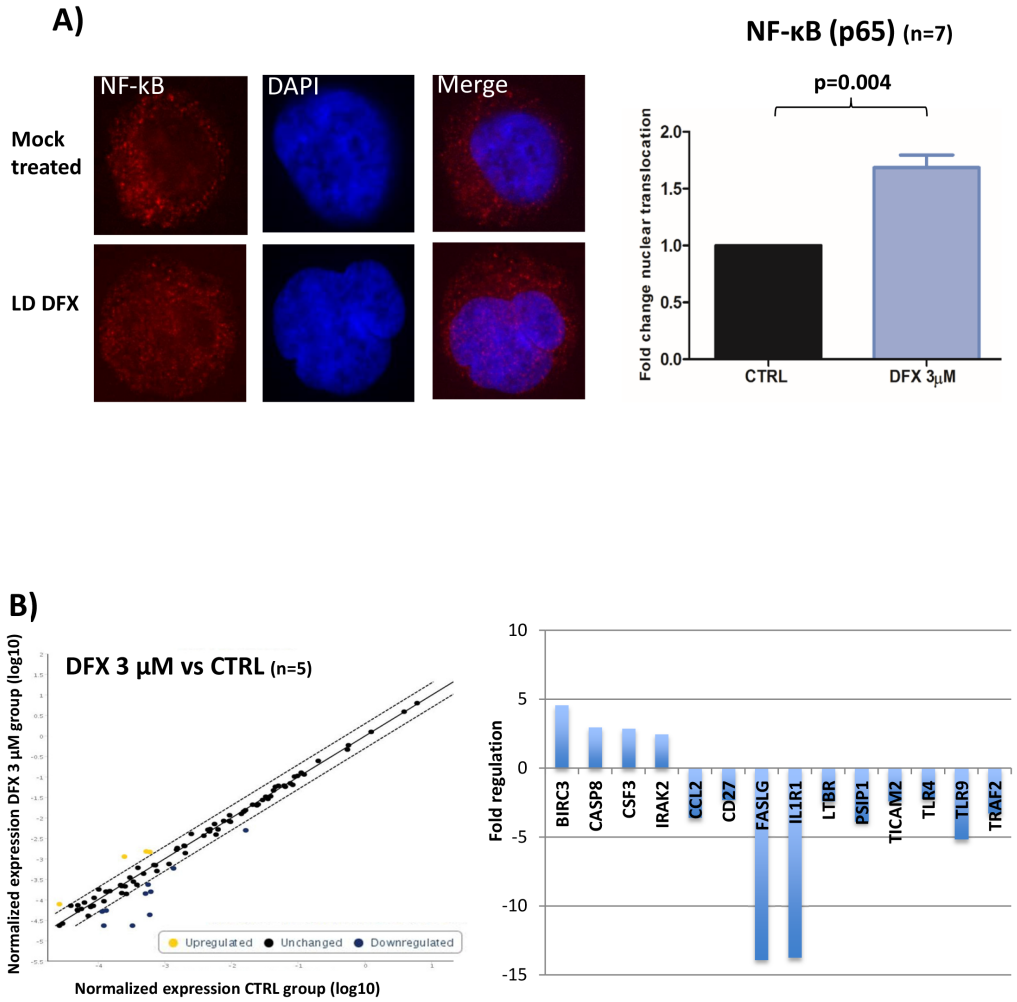


Figure 2: **(A)** Results of confocal immunofluorescence microscopy assays for NF-κB (n=7). Nuclei are stained in blue; the red signal represents the p65 subunit of NF-κB; x 63. Histogram representing the fold of change of NF-κB nuclear translocation. Data were analyzed by a specific software (ICY) to determine the nuclear fluorescence of NF-κB in the nucleus. Data were normalized to the CTRL condition in each case. **(B)** Results of the RT-qPCR microarray plates used to assess the impact of DFX on the expression of 84 known gene targets of NF-κB activation (n=5). Scatter plots represent the normalized expression of NF-κB targeted genes between DFX and CTRL conditions. The central line indicates unchanged gene expression. The dotted lines indicate the selected 2-fold regulation threshold. Data points beyond the dotted lines in the upper left area (yellow) are over expressed genes and those in the lower right sections (blue) are under expressed genes. Baculoviral IAP Repeat Containing 3 (BIRC3), caspase 8 (CASP8), Colony Stimulating Factor 3 (CSF3), and Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 2 (IRAK2). Fas Ligand (FASLG), Interleukin 1 Receptor Type 1 (IL1R1), Toll Like Receptor 9 (TLR9), PC4 and SFRS1 Interacting Protein 1 (PSIP1), C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2), TNF Receptor Associated Factor 2 (TRAF2), Lymphotoxin Beta Receptor (LTBR), Toll Like Receptor Adaptor Molecule 2 (TICAM2), CD27, and Toll Like Receptor 4 (TLR4).

Cellular iron homeostasis is regulated by iron regulatory proteins (IRP) which are cytoplasmic RNA-binding proteins either stabilizing mRNAs by recognizing RNA motifs, termed Iron-Responsive Elements (IRE), located on 3' untranslated regions (3'UTR), such as for transferrin receptor 1, or impairing translation of those for which IRE are on the 5'UTR, as for the ferritin subunits [22]. To determine if LD DFX perturbs iron homeostasis, the activity of the Iron Regulatory Proteins (IRP) was measured by RNA electrophoretic mobility shift assay (REMSA) on K562 cells treated with increasing doses of DFX (Figure 3B). The cell line was grown in iron-overloaded medium to mimic the conditions experienced by MDS progenitors. An increase of the IRP activity present in K562 cells was only seen by applying 300 µM of DFX to the culture for 48 hours (Figure 3B lane 5), whereas 3 µM DFX (lane 3) did not change the activity present in control cells (lane 1). In all cases, this basal activity reflected only a minority (< 10% Figure 3C) of the total IRP present in the samples, as revealed by treatment of the lysates with β-mercaptoethanol (lanes 2,4,6). These results indicate that, although LD DFX induced a decrease of total cellular iron (Figure 3A), this low dose did not change the availability of functional iron as detected by the activity of the IRP.

LD DFX protects cells from oxidative stress

We assessed ROS levels in 9 different MDS samples during erythroid differentiation after 10 (D10) or 14 (D14) days in culture (Figure 4A). Intracellular oxidizing species, such as the superoxide radical anion, were measured with the fluorescent DHE probe. At D14, LD DFX (n=8) decreased the level of DHE-reactive species (average RFI: 6.86 (3.52-10.12)) as compared to CTRL (average RFI: 9.05 (4.77-15.76)) corresponding to a 20% average decrease (p=0.04). In the same experimental conditions, the mitochondria-targeted superoxide-reacting MitoSOX probe detected an average decrease of 58% (p=0.03) with LD DFX (n=9) (average RFI: 21 (7.33-33.2) compared to CTRL (average RFI: 30.7 (13.7-48.3)).

Thereafter, we sought to determine whether some metabolites and antioxidant enzymes participating to the cellular redox homeostasis could be regulated by LD DFX. The Malondialdehyde (MDA) level ($p<0.05$) was slightly decreased with LD DFX, but no impact of DFX on carbonyls levels was observed (Figure 4B). Neither SOD (SOD1-3) activity nor the GSH/GSSH ratio were significantly changed after LD DFX treatment (Figure 4B).

Remarkably, GPx activity was not detected in 6 different MDS samples in the iron overloaded system

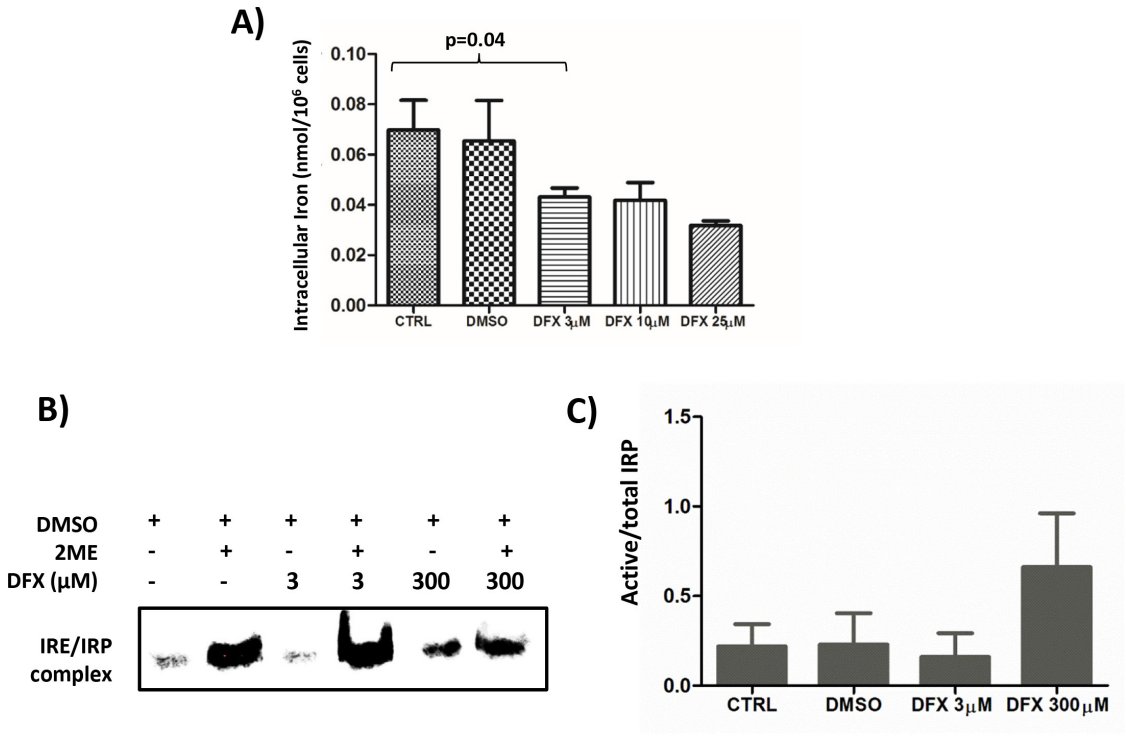


Figure 3: **(A)** Decreased intracellular iron content after DFX treatment as measured by ICP-MS. K562 cells were treated with increased doses of DFX for 48 hours (n=4). **(B)** Representative (n=2) Iron Regulatory protein (IRP) activity in K562 cells treated with increasing concentrations of DFX. IRP activity was assessed by REMSA using an Iron Responsive Element (IRE) biotin-labeled probe. The apo-IRP form was activated after treatment with 2-mercaptoethanol (2ME). **(C)** Histogram representing the ratio of the measured IRP activity divided by the total of IRP activity revealed by the 2-mercaptoethanol treatment (n=2).

and, likewise, in 4 different MDS samples cultured in the more conventional, non-iron overloaded medium (data not shown). GPx4 and GPx8 were recently involved in redox homeostasis during erythroid differentiation [23]. They were tested by RT-qPCR in seven different MDS samples cultured in iron-overloaded medium. GPx8 mRNA was only present in 1 sample, whereas GPx4 mRNA was present in all MDS samples without difference in relative expression in the presence of LD DFX (data not shown). Western blots confirmed the presence of the GPx4 protein in samples of MDS patients treated or not with LD DFX and also in a healthy donor sample (Figure 4C). We performed lysis of 3 MDS samples under nitrogen to avoid oxidative damage to the highly reactive active site selenocysteine of GPx4. As expected, GPx activity was detected, meaning that this activity was inhibited under oxygen-saturated conditions in the conventional lysis procedure. GPx activity was not modified by the LD DFX treatment (data not shown).

These results outlined that the redox molecular shift associated with decreased oxidizing species induced by LD DFX was responsible for the lowered MDA

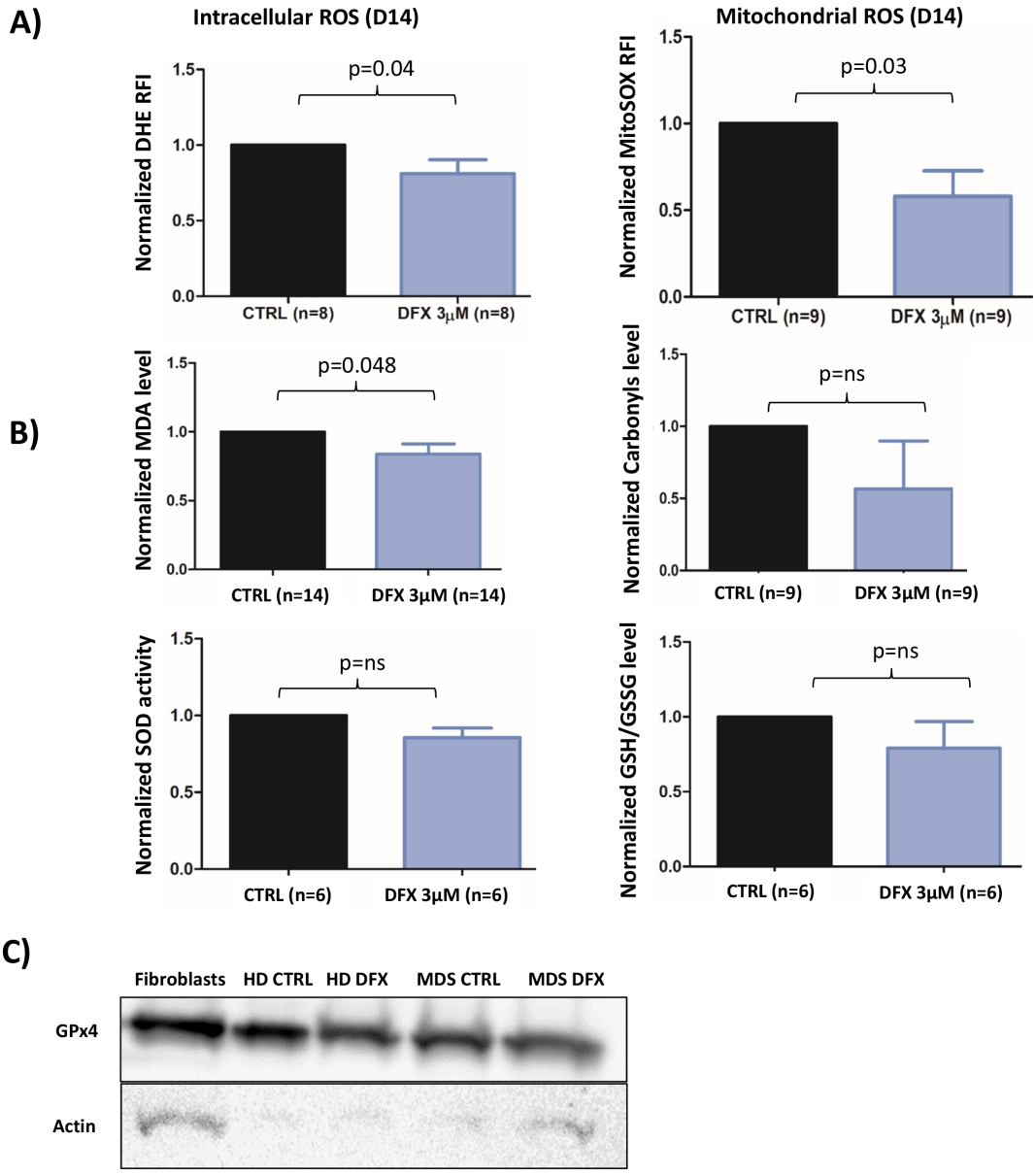


Figure 4: **(A)** Flow cytometry analysis of intracellular ROS with DHE staining (n=8) and mitochondrial ROS with MitoSOX probe (n=9) at D14 of the cell culture procedure. The data are normalized to the CTRL condition in each case. **(B)** Levels of MDA, Carbonyls, Glutathione and SOD (SOD 1-3) activity normalized to the CTRL condition. **(C)** Western blot of GPX4 for MDS patient (three samples were pooled) and healthy donor (n=1). Fibroblasts were used as a positive control.CTRL: control; DMSO: Dimethylsulfoxyde; REMSA: RNA electrophoretic mobility shift assay; HD: healthy donor; IRP: Iron response protein; IRE: Iron Responsive Element; MDA: Malondialdehyde; ROS: reactive oxygen species; SOD: superoxide dismutase.

values (Figure 4B). Interestingly, lipid peroxidation is a hallmark of iron-dependent regulated necrosis, also termed as ferroptosis, which might be indicated by lowered MDA values. Therefore, we asked whether LD DFX might protect cells from ferroptosis when iron overload conditions were applied. For this purpose, the gene expression levels of 6 biomarkers of ferroptosis [24] were measured by RT-qPCR. After LD DFX treatment, the expression of these genes remained unchanged as compared to CTRL (Supplementary Figure 4). In addition, DFX did not interfere with the GPx4 activity, another hallmark of ferroptosis. Therefore, ferroptosis is not a death mechanism impacted by LD DFX under our experimental conditions.

NFKB is regulated by an extremely fine control of ROS levels

To demonstrate the tight correlation between DFX, ROS downregulation and activation of the NFκB pathway, we have engineered a cellular model by a strategy described previously [25] to silence thioredoxin (TRX) gene expression by stable RNA interference. The two isoforms of thioredoxin, Trx1 expressed in the cytoplasm and nucleus and Trx2 localized within the mitochondria, contribute to the intracellular redox equilibrium. Trx play a dual role by inhibiting NF-kB nuclear translocation under oxidizing conditions, and by enhancing its binding to DNA [26]. TRX^{KD} knock-down cells were analyzed by Western blot (Figure 5A). As a CTRL, we established K652 cells stably expressing an inefficient shRNA sequence which has been widely used in previous studies [27].

Without adding excess iron in the growth medium, $TRX1^{KD}$ cells exhibited a 1,8-fold increase of both DHE (p=0.008) and MitoSOX fluorescence (p=0.01) (Figure 5B and 5C). Conversely, in this condition, $TRX2^{KD}$ cells failed to exhibit significant changes. Hence, Trx1 might be a more efficient factor against the oxidative stress detected by these probes than Trx2. Under the same conditions, NF-κB was not activated in both $TRX1^{KD}$ and $TRX2^{KD}$ cells (Figure 5D) as assessed by a luciferase reporter assay. The cellular redox equilibrium was challenged by adding ferric ammonium sulfate (FAS, 100μM), LD DFX, or a conventional antioxidant molecule, N-acetylcysteine (NAC 1mM) to the culture medium of K562 cells. In CTRL K562 cells, addition of FAS induced a 1.8-fold increase of DHE fluorescence (Figure 5E) and a 8-fold increase of MitoSOX signal (Figure 5F) in comparison to basal conditions (Figure 5B and 5C).

When excess iron (FAS) was added, the fluorescence of $TRX1^{KD}$ K562 cells exhibited a 3.1-fold increase and 13-fold increase for DHE and MitoSOX signals, respectively, as compared to basal conditions (Figure 5E and 5F *versus* 5B and 5C, blue columns). Interestingly, LD DFX induced a significant decrease of fluorescence (20%) for both DHE (p=0.001) and MitoSOX (p=0.02), whereas NAC only decreased DHE fluorescence (p=0.04). Furthermore, DFX triggered NF-κB activation (p=0.03) in $TRX1^{KD}$ K562 cells in the presence FAS (100 μM) (Figure 5G, blue columns), which was consistent with the increased nuclear translocation of NF-κB visualized by immunofluorescence microscopy (p=0.04) (Figure 5H, blue columns). Whereas NAC induced a minor decrease of ROS level compared to DFX (Figure 5E), it was not associated with an increase of NF-κB activation measured by both confocal microscopy and luciferase reporter.

In $TRX2^{KD}$ K562 cells, we observed a 2.6 and 11.8-fold increase for DHE and MitoSOX signals, respectively, as compared to basal conditions (Figure 5E and 5F *versus* 5B and 5C, green columns). NAC was not associated with any significant decrease of ROS levels. In contrast, LD DFX significantly decreased the level measured with the DHE probe, although this decrease was not significant with MitoSOX. However, DFX and NAC did not induced NF-κB activation in $TRX2^{KD}$ K562 cells (Figure 5G and 5H, green columns).

Collectively, these results indicated that NF-κB activation in our iron overload model depended on Trx1. NF-κB is finely regulated by the levels of oxidative species and it is consistently increased by LD DFX under these conditions.

Translational application of low dose of DFX

Based on these *in vitro* results, and because deferasirox is currently used treatment of iron overload, its effectiveness at low dose (5 mg/kg/day corresponding to a plasmatic level of 3μM) in MDS patients was evaluated locally in our clinical center. At the usual recommended dosage (20 mg/kg/day), DFX usually induces many side-effects and poor tolerance. Six anemic patients (2 Refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD), 1 idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS), 1 refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS), 1 refractory anemia (RA) and one MDS with del5q) were followed and treated with 5 mg/kg/day of DFX. These patients displayed the following inclusion criteria: low risk MDS, anemia refractory to erythropoiesis stimulating agents or high endogenous level of EPO (>500IU/L) and plasma ferritin (< 1000μg/l). They were treated prospectively with a low dose of DFX (5 mg/kg per day) corresponding approximately to the 3μM concentration used in the *in vitro* analyses according to blood plasma (6.31μM [1.072-16]) and medullar plasma (2μM [1.072-2.546]) level measurements. The plasma level of deferasirox was checked *ex vivo* and corrections of its posology were made accordingly. Three of the patients included required monthly RBC transfusions before the beginning of the DFX treatment. The hemoglobin levels of the patients did not reach normal recommended values, but they were stabilized leading to transfusion independence or diminution of the transfusion frequency (Figure 6A).

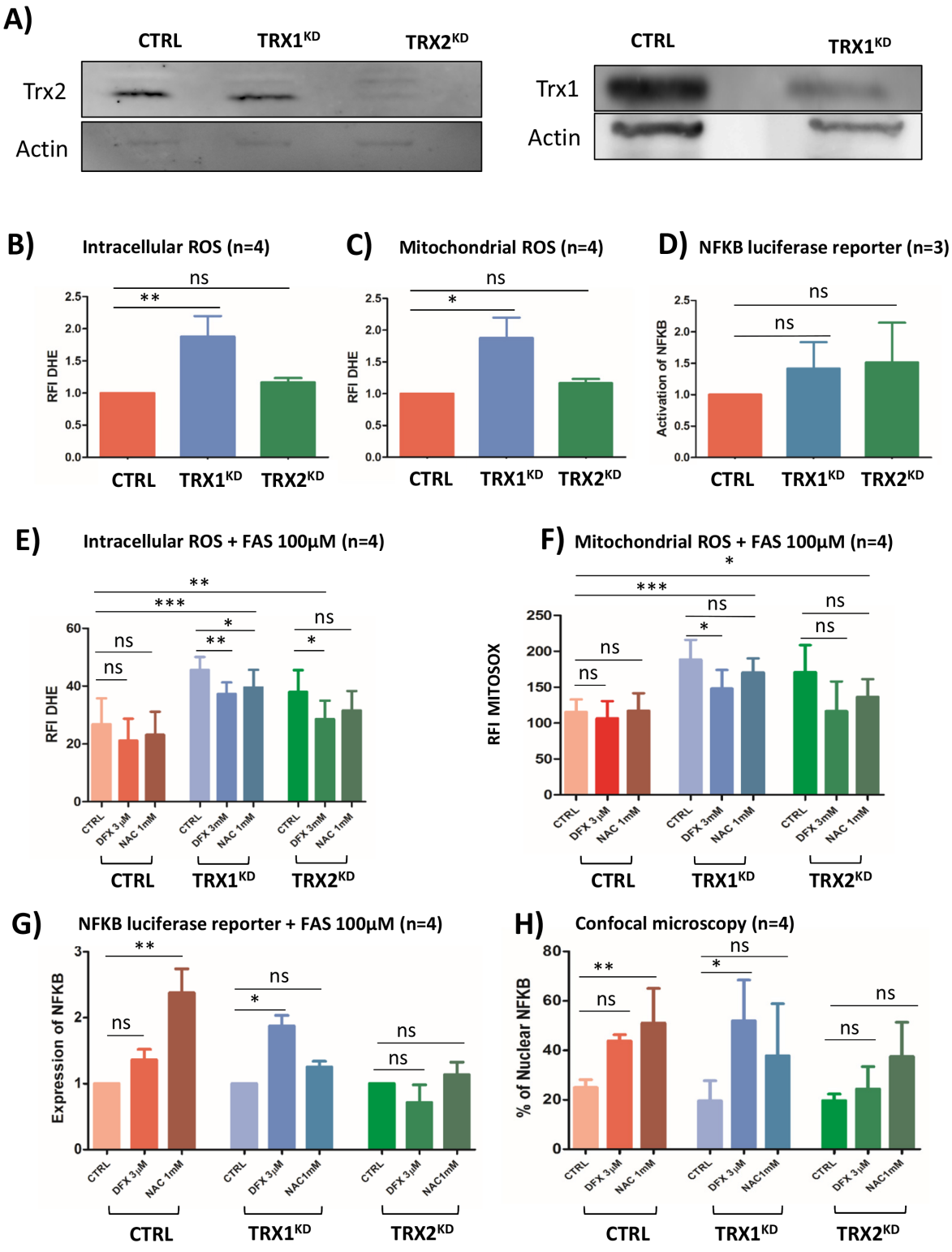


Figure 5: **(A)** Western blot analysis of Trx1 and Trx2 protein levels in stable TRX1^{KD} and TRX2^{KD} K562 cells. Trx1 and Trx2: 13 kDa; actin: 42 kDa. **(B)** Flow cytometry analysisof intracellular ROS with DHE staining (n=4) in CTRL and stable TRX^{KD} K562 cells without iron overload. **(C)** Same experiment as in B for mitochondrial ROS with MitoSOX probe (n=4). **(D)** Assessment of NF-κB activity with a luciferase reporter assay (n=4) in TRX^{KD} K562 cells without iron overloaded condition. **(E)** Same experiment as in B with FAS (100µM) and DFX 3µM or NAC 1mM. **(F)** Same experiment as in C with FAS (100µM) and DFX 3µM or NAC 1mM. **(G)** Same experiment as in D with FAS (100µM) and DFX 3µM or NAC 1mM. **(H)** Quantification of NF-κB translocation by confocal microscopy for K562 cells as described in (G). (FAS: ammonium sulfate to the medium, DFX: deferasirox, NAC: N-acetylcysteine; RFI: ratio of fluorescence; KD: knock-down; TRX: thioredoxin; *: <0.05; **: <0.001; ***: <0.0001).

Currently, after 2 years of follow-up, the median time to transfusion independence after DFX treatment was 9.6 months (Figure 6B). Moreover, if we consider the definition of transfusion independence according to IWG 2006 [28] criteria, all patients treated with LD DFX became transfusion-independent. No side-effects were reported.

DISCUSSION

In this study, we have demonstrated that low doses of deferasirox below 7.5 µM had a beneficial effect on erythropoiesis in low risk MDS patients *in vitro*. The higher proliferation rate observed with LD DFX is due to the combination of increased cycling cells and protection

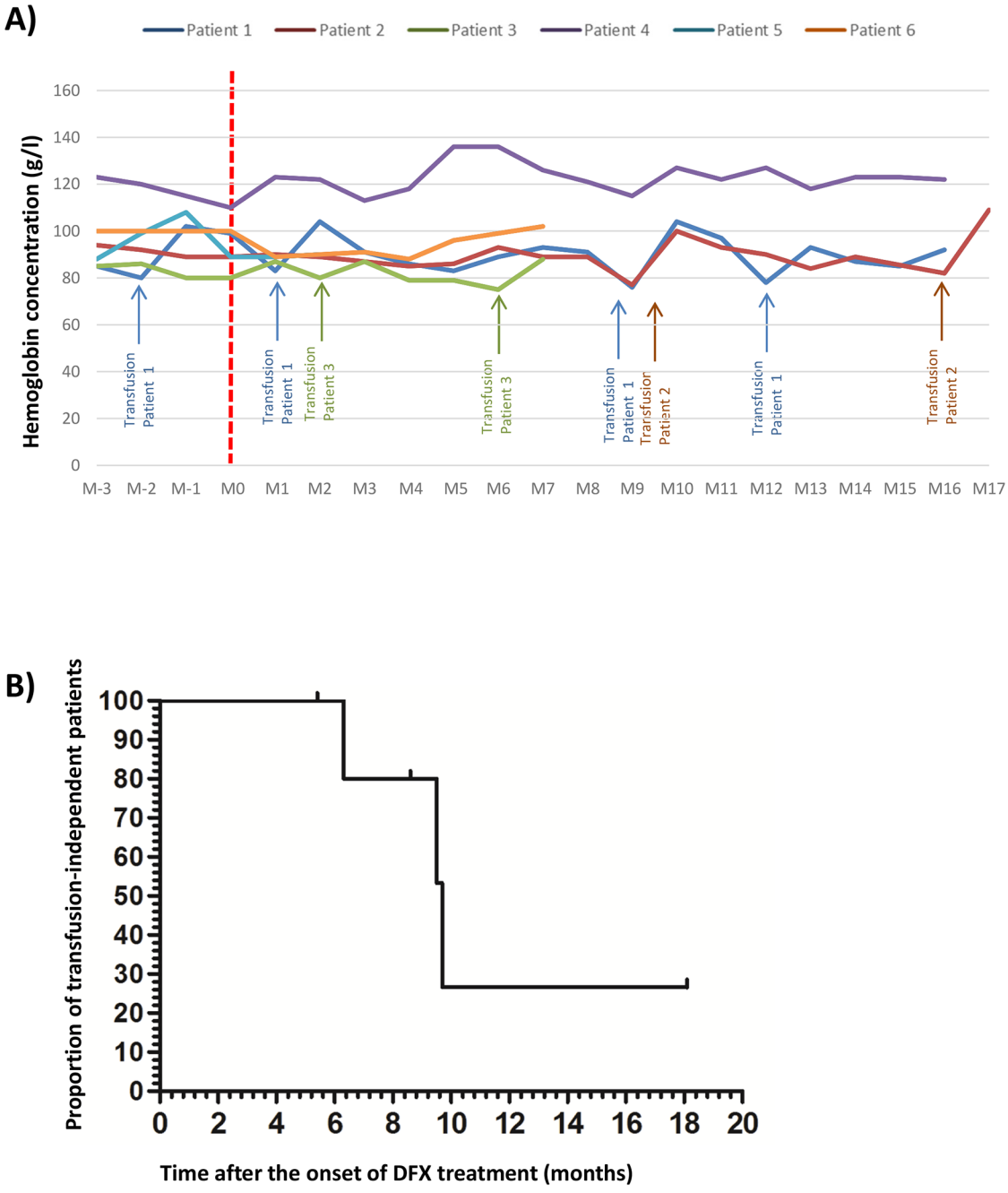


Figure 6: **(A)** Evolution of the hemoglobin level for 6 anemic patients with low risk MDS and refractory to erythropoiesis stimulating agents treated by low dose of deferasirox (DFX) before and after the beginning of DFX; initial hemoglobin level = T0 DFX). **(B)** Evolution of the proportion of untransfused patients after DFX treatment for the 6 anemic patients with low risk MDS and refractory to erythropoiesis stimulating agents treated by low dose of DFX.D: day; Hb: hemoglobin level, M: month.

against apoptosis linked to enhanced NF-κB activation regulated by ROS levels.

The aim of our study was to unravel the positive effect of LD DFX on erythroid proliferation. Indeed, we have tested elevated concentrations of DFX, such as 20μM, which is currently measured in the plasma of patients taking DFX for iron chelation purpose (between 20 to 30 mg/kg/day). However these high doses were toxic for erythroid progenitors in our cellular model. Pullarkat et al [29] have demonstrated a benefit of low dose of deferasirox (5μM) on proliferation and toxicity for hematopoietic progenitors at higher doses, which was confirmed herein. Moreover, Messa et al [30] observed that a higher dose of DFX (50μM) induced apoptosis in two leukemic cell lines. Paubelle et al [31] had successfully used high doses of DFX (30 mg/kg) for treating elderly leukemic patients attesting the antileukemic effects of these doses. Altogether, these controversial results stressed that DFX displays a biphasic mode of action, with erythroid proliferation of progenitors of MDS patients at low doses and inhibition at the highest doses. For better understanding of the consequences of a LD DFX treatment on hematopoiesis, we have followed the clonal expansion of a mutated clone in the implemented liquid culture model. Regarding the results of the NGS experiments, we could rule out this possibility. LD DFX seemed unable to promote clonal hematopoiesis despite NF-κB activation which has been proved to be activated in high risk MDS [30]. Therefore, LD DFX maintained a normal hematopoiesis expansion.

One of the main aspects of our work was to investigate more deeply the connections between exposure to LD DFX and iron homeostasis by measuring the Iron Regulatory Proteins (IRP) activity: the lower the functionally available iron, the higher the IRP activity [21]. Recently, Pourcelot et al [21] have introduced the notion of functional intracellular iron concentration (FIC). FIC is the needed iron for cell homeostasis and IRP activity is the better way to measure it. In contrast, labile iron concentration (LIC) is the redox fraction implicated in Fenton reaction. In this study, our results indicate that LD DFX induced a decrease of total cellular iron leading to ROS protection probably due to a decrease of LIC but this decrease did not change the availability of FIC detected by the activity of the IRP. Herein, we demonstrate that LD DFX functional effects on iron loaded hematopoietic progenitors are not due mainly to the iron chelation properties of the drug but essentially to the protective effect of LD DFX on oxidative stress. Reactive oxygen species play an important role in the physiopathogenesis of MDS [32] and in other myeloid malignancies [33]. In our study, we showed that MDS progenitors, in the presence of iron excess, produce high levels of cytoplasmic and mitochondrial ROS. Malondialdehyde (MDA), the most mutagenic product of lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids, also interacts with and modulates proteins. We highlighted that LD DFX decreased MDA levels. Lipid peroxidation, associated with decreased GPx4 activity, is a hallmark of ferroptosis which is a form of non-apoptotic programmed cell death induced by iron excess and dependent on GSH depletion [34]. We did not observe any modification in genes specifically involved in ferroptosis after DFX treatment, suggesting that LD DFX might protect cells from death by inhibiting apoptosis but not ferroptosis. Besides, we suggest that the protecting effects of DFX on lipid peroxidation is tightly correlated with ROS downregulation.

The main signaling pathways activated in erythroid progenitors are PI3K/AKT, mTOR, MAPkinase and NF-κB [35, 36]. In our cell model, we observed enhanced NF-κB nuclear translocation followed by activation of specific target genes strengthening that NF-κB was directly activated by LD DFX. Interestingly, we detected the repression of genes required during apoptosis and others involved in the inflammatory response of NF-κB mediated by IL-1 and TLR stimuli. In the context of increased inflammatory signals triggered by the S100A9 protein via TLR4 and the inflammasome NLRP3 [37], it was noteworthy that LD DFX inhibited both IL1R1 and TLR4 expressions.

NF-κB is one of the first transcription factor that was recognized to be redox-regulated. While some NF-κB-regulated genes are key factors in redox homeostasis, ROS can act as secondary messengers and interfere with NF-κB signaling pathways. Among the diversity of mechanisms controlling NF-κB activities, a major one depends on IκB inhibitors and IκB kinases (IKKs) for governing NF-κB activation, degradation, DNA binding and transcriptional activity [38]. While oxidative stress generally activates NF-κB [39], recent studies suggested that ROS could repress NF-κB pathway. Indeed, ROS appeared to activate NF-κB DNA binding activities during the early phase of oxidative stress, mainly by abrogating the inhibitory action of IκB inhibitors [40]. In later phases of oxidative injury, ROS may repress NF-κB. One possible mechanism is oxidation of IKKs, blocking IκK phosphorylation, and then hampering NF-κB activation [41]. In our model, it appears that decreased ROS levels induced by LD DFX can restore NF-κB activity through such a mechanism.

Our results supported that NF-κB signaling was modulated by a fine-tuning of the intracellular redox state. Because thioredoxins (Trx) are among the major endogenous redox-regulating molecules with thiol reducing activity, we have engineered stable K562 cells silenced for TRX1 or TRX2 genes [40]. The literature reveals controversial data concerning thioredoxin and NF-κB signaling. Trx could play dual and opposite roles toward NF-κB activities depending on its subcellular localization (cytoplasmic *versus* nuclear compartments). Trx1 could trigger NF-κB nuclear translocation and

activation through a tight interaction with p50/RelA subunits, protecting critical cysteines from oxidative injuries [42, 43]. Older studies also pointed out the negative and positive regulation of NF-κB by Trx [43–45]. In our cell model, we combined TRX1 and TRX2 knock-down with FAS culture conditions to modulate total cellular and mitochondrial ROS. We showed that DFX reduced the ROS amount and induced NF-κB activation in a Trx1-dependent manner. NAC induced decrease of ROS levels in TRX(1-2)$^{-/-}$ conditions, but this decrease was not as important as that induced by low dose DFX. We can hypothesize that ROS levels need to be sufficiently decreased to induce NFKB activation.

The translational application in our center of low dose of DFX for 6 low risk MDS patients showed improvement of erythropoiesis and a longer median time to transfusion dependence: 9.6 versus 6.1 months, if we consider the results obtained in the European cohort concerning MDS EPO refractory patients [46]. These results provide a rationale for a French prospective clinical trial which will propose LD DFX (5 mg/kg/day) in MDS patients refractory to erythropoiesis stimulating agents (N° EudraCT: 2017-001258-33).

To summarize, we have shown novel effects of LD deferasirox on NF-κB by fine modulation of ROS levels in low risk MDS erythroid progenitors. These results suggest that protection of MDS patients' bone marrow from oxidative stress should be considered early in the course of their disease, and before the development of a significant iron overload which requires high dose of DFX which does not result in erythroid improvement.

MATERIALS AND METHODS

Cell samples

Bone marrow from low risk myelodysplastic patients and healthy donors were collected by bone marrow aspiration after signed consent and approval by our local ethical committee. Bone marrow aspirations were done for MDS diagnosis and also for the exploration of all kinds of cytopenia. When bone marrow morphology was normal, it was considered as healthy donor. CD34^{+} selection is described in supplementary methods. The K562 chronic myelogenous leukemia cell line was originally obtained from the ATCC biological resource. The K562 cells were grown in RPMI medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 100 UI of penicillin/ml and 0.1 mg streptomycin/ml at 37°C with 5% CO2.

Cell culture procedure for erythropoiesis study

We used a 2 step-liquid culture procedure as already described [47, 48]. Details are given in supplementary methods.

Other methods

Description for all other assays and techniques are given in supplementary methods.

Statistical methods

The significance of the experimental results was determined with a 2-tailed paired Student test. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. All statistical analyses were done with GraphPad Prism 5 software (http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/). Data are mean with SEM.

Author contributions

Contribution: M.M., JM.M., S.A., Y.W., C.L., J.A., C.G., M.P., G.S., N.D., and C.P. performed experiments; M.M., JM.M., D.B., JY.C, B.P. and S.P designed the research, analyzed results and wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

This work was supported by Novartis. JMM thanks the financial support of Université Joseph Fourier Grenoble (Programme AGIR 2013). MM has received a financial grant from Université Joseph Fourier Grenoble (Programme AGIR 2014) and of Bourse "Espoir Sandrine".

CONFLICTS OF INTEREST

Sophie Park: research funding by Novartis. The remaining authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood. 2002; 100:2292-302.
2. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood. 1997; 89:2079-88.
3. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. Blood. 2012; 120:2454-65. https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420489.
4. Parker JE, Mufti GJ. Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes. Br J Haematol. 1998; 101:220-30.

5. Gersuk GM, Beckham C, Loken MR, Kiener P, Anderson JE, Farrand A, Troutt AB, Ledbetter JA, Deeg HJ. A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. Br J Haematol. 1998; 103:176-88.

6. Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, Passamonti F, Arcaini L, Maffioli M, Bernasconi P, Lazzarino M, Cazzola M. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. J Clin Oncol. 2005; 23:7594-603.

7. Bennett JM. Consensus statement on iron overload in myelodysplastic syndromes. Am J Hematol. 2008; 83:858-61. https://doi.org/10.1002/ajh.21269.

8. Santini V, Alessandrino PE, Angelucci E, Barosi G, Billio A, Di Maio M, Finelli C, Locatelli F, Marchetti M, Morra E, Musto P, Visani G, Tura S. Clinical management of myelodysplastic syndromes: update of SIE, SIES, GITMO practice guidelines. Leuk Res. 2010; 34:1576-88. https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.01.018.

9. List AF. Iron overload in myelodysplastic syndromes: diagnosis and management. Cancer Control. 2010; 17:2-8.

10. Leitch HA. Improving clinical outcome in patients with myelodysplastic syndrome and iron overload using iron chelation therapy. Leuk Res. 2007; 31:S7-9.

11. Messa E, Cilloni D, Messa F, Arruga F, Roetto A, Saglio G. Deferasirox treatment improved the hemoglobin level and decreased transfusion requirements in four patients with the myelodysplastic syndrome and primary myelofibrosis. Acta Haematol. 2008; 120:70-4. https://doi.org/10.1159/000158631.

12. Breccia M, Loglisci G, Salaroli A, Cannella L, Santopietro M, Alimena G. Deferasirox treatment interruption in a transfusion-requiring myelodysplastic patient led to loss of erythroid response. Acta Haematol. 2010; 124:46-8. https://doi.org/10.1159/000314961.

13. Molica M, Salaroli A, Alimena G, Breccia M. Haematological improvement as a beneficial effect during deferasirox treatment in transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndrome. Blood Transfus. 2014; 12:s162-3. https://doi.org/10.2450/2013.0005-13.

14. Guariglia R, Martorelli MC, Villani O, Pietrantuono G, Mansueto G, D'Auria F, Grieco V, Bianchino G, Lerose R, Bochicchio GB, Musto P. Positive effects on hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndrome receiving deferasirox as oral iron chelation therapy: a brief review. Leuk Res. 2011; 35:566-70. https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.11.027.

15. Capalbo S, Spinosa G, Franzese MG, Palumbo G. Early deferasirox treatment in a patient with myelodysplastic syndrome results in a long-term reduction in transfusion requirements. Acta Haematol. 2009; 121:19-20. https://doi.org/10.1159/000209206.

16. Badawi MA, Vickars LM, Chase JM, Leitch HA. Red blood cell transfusion independence following the initiation of iron chelation therapy in myelodysplastic syndrome. Adv Hematol. 2010; 2010:164045. https://doi.org/10.1155/2010/164045.

17. Oliva EN, Ronco F, Marino A, Alati C, Pratico G, Nobile F. Iron chelation therapy associated with improvement of hematopoiesis in transfusion-dependent patients. Transfusion. 2010; 50:1568-70. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02617.x.

18. List AF, Baer MR, Steensma DP, Raza A, Esposito J, Martinez-Lopez N, Paley C, Feigert J, Besa E. Deferasirox reduces serum ferritin and labile plasma iron in RBC transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndrome. J Clin Oncol. 2012; 30:2134-9. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.1222.

19. Gattermann N, Jarisch A, Schlag R, Blumenstengel K, Goebeler M, Groschek M, Losem C, Procaccianti M, Junkes A, Leismann O, Germing U. Deferasirox treatment of iron-overloaded chelation-naive and prechelated patients with myelodysplastic syndromes in medical practice: results from the observational studies eXtend and eXjange. Eur J Haematol. 2012; 88:260-8. https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2011.01726.x.

20. Angelucci E, Santini V, Di Tucci AA, Quaresmini G, Finelli C, Volpe A, Quarta G, Rivellini F, Sanpaolo G, Cilloni D, Salvi F, Caocci G, Molteni A, et al. Deferasirox for transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndromes: safety, efficacy, and beyond (GIMEMA MDS0306 Trial). Eur J Haematol. 2014; 92:527-36. https://doi.org/10.1111/ejh.12300.

21. Pourcelot E, Lenon M, Mobilia N, Cahn JY, Arnaud J, Fanchon E, Moulis JM, Mossuz P. Iron for proliferation of cell lines and hematopoietic progenitors: nailing down the intracellular functional iron concentration. Biochim Biophys Acta. 2015; 1853:1596-605. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.009.

22. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A red carpet for iron metabolism. Cell. 2017; 168:344-61. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.034.

23. Canli O, Alankus YB, Grootjans S, Vegi N, Hultner L, Hoppe PS, Schroeder T, Vandenabeele P, Bornkamm GW, Greten FR. Glutathione peroxidase 4 prevents necroptosis in mouse erythroid precursors. Blood. 2016; 127:139-48. https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-654194.

24. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 2012; 149:1060-72. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042.

25. Biard DS. Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. Nucleic Acids Res. 2007; 35:3535-50. https://doi.org/10.1093/nar/gkm195.

26. Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. J Biol Chem. 1999; 274:27891-7.

27. Biard DS, Despras E, Sarasin A, Angulo JF. Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimick human syndromes: application to NER gene silencing. Mol Cancer Res. 2005; 3:519-29. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0044.

28. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, Pinto A, Beran M, de Witte TM, Stone RM, Mittelman M, Sanz GF, Gore SD, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. Blood. 2006; 108:419-25. https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4149.

29. Pullarkat V, Sehgal A, Li L, Meng Z, Lin A, Forman S, Bhatia R. Deferasirox exposure induces reactive oxygen species and reduces growth and viability of myelodysplastic hematopoietic progenitors. Leuk Res. 2012; 36:966-73. https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.03.018.

30. Messa E, Carturan S, Maffe C, Pautasso M, Bracco E, Roetto A, Messa F, Arruga F, Defilippi I, Rosso V, Zanone C, Rotolo A, Greco E, et al. Deferasirox is a powerful NF-kappaB inhibitor in myelodysplastic cells and in leukemia cell lines acting independently from cell iron deprivation by chelation and reactive oxygen species scavenging. Haematologica. 2010; 95:1308-16. https://doi.org/10.3324/haematol.2009.016824.

31. Paubelle E, Zylbersztejn F, Alkhaeir S, Suarez F, Callens C, Dussiot M, Isnard F, Rubio MT, Damaj G, Gorin NC, Marolleau JP, Monteiro RC, Moura IC, et al. Deferasirox and vitamin D improves overall survival in elderly patients with acute myeloid leukemia after demethylating agents failure. PLoS One. 2013; 8:e65998. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065998.

32. Omidvar N, Kogan S, Beurlet S, le Pogam C, Janin A, West R, Noguera ME, Reboul M, Soulie A, Leboeuf C, Setterblad N, Felsher D, Lagasse E, et al. BCL-2 and mutant NRAS interact physically and functionally in a mouse model of progressive myelodysplasia. Cancer Res. 2007; 67:11657-67. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0196.

33. Rassool FV, Gaymes TJ, Omidvar N, Brady N, Beurlet S, Pla M, Reboul M, Lea N, Chomienne C, Thomas NS, Mufti GJ, Padua RA. Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: a model for genomic instability with progression in myeloid leukemia? Cancer Res. 2007; 67:8762-71. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4807.

34. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, Brown LM, Girotti AW, Cornish VW, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. Cell. 2014; 156:317-31. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010.

35. Frisan E, Pawlikowska P, Pierre-Eugene C, Viallon V, Gibault L, Park S, Mayeux P, Dreyfus F, Porteu F, Fontenay M. p-ERK1/2 is a predictive factor of response to erythropoiesis-stimulating agents in low/int-1 myelodysplastic syndromes. Haematologica. 2010; 95:1964-8. https://doi.org/10.3324/haematol.2010.024349.

36. Zhang X, Camprecios G, Rimmele P, Liang R, Yalcin S, Mungamuri SK, Barminko J, D'Escamard V, Baron MH, Brugnara C, Papatsenko D, Rivella S, Ghaffari S. FOXO3-mTOR metabolic cooperation in the regulation of erythroid cell maturation and homeostasis. Am J Hematol. 2014; 89:954-63. https://doi.org/10.1002/ajh.23786.

37. Basiorka AA, McGraw KL, Eksioglu EA, Chen X, Johnson J, Zhang L, Zhang Q, Irvine BA, Cluzeau T, Sallman DA, Padron E, Komrokji R, Sokol L, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a driver of the myelodysplastic syndrome phenotype. Blood. 2016; 128:2960-75. https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-730556.

38. Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. Antioxid Redox Signal. 2005; 7:395-403. https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.395.

39. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H2O2 and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. EMBO J. 1993; 12:2005-15.

40. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. Cell Res. 2011; 21:103-15. https://doi.org/10.1038/cr.2010.178.

41. Schoonbroodt S, Piette J. Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. Biochem Pharmacol. 2000; 60:1075-83.

42. Harper R, Wu K, Chang MM, Yoneda K, Pan R, Reddy SP, Wu R. Activation of nuclear factor-kappa b transcriptional activity in airway epithelial cells by thioredoxin but not by N-acetyl-cysteine and glutathione. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001; 25:178-85. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.2.4471.

43. Matthews JR, Wakasugi N, Virelizier JL, Yodoi J, Hay RT. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. Nucleic Acids Res. 1992; 20:3821-30.

44. Hirota K, Matsui M, Murata M, Takashima Y, Cheng FS, Itoh T, Fukuda K, Yodoi J. Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF-kappaB, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 274:177-82. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3106.

45. Hayashi T, Ueno Y, Okamoto T. Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. J Biol Chem. 1993; 268:11380-8.

46. Garelius HK, Johnston WT, Smith AG, Park S, de Swart L, Fenaux P, Symeonidis A, Sanz G, Cermak J, Stauder R, Malcovati L, Mittelman M, van de Loosdrecht AA, et al. Erythropoiesis-stimulating agents significantly delay the onset of a regular transfusion need in nontransfused patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. J Intern Med. 2017; 281:284-99. https://doi.org/10.1111/joim.12579.

47. Claessens YE, Bouscary D, Dupont JM, Picard F, Melle J, Gisselbrecht S, Lacombe C, Dreyfus F, Mayeux P, Fontenay-Roupie M. in vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. Blood. 2002; 99:1594-601.

48. Panzenbock B, Bartunek P, Mapara MY, Zenke M. Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. Blood. 1998; 92:3658-68.

Reactive oxygen species levels control NF-κB activation by low dose deferasirox in erythroid progenitors of low risk myelodysplastic syndromes

SUPPLEMENTARY MATERIALS

CD34$^+$ selection from primary samples

By density gradient using Ficoll (Eurobio), the mononuclear cells were isolated from total bone marrow. HSPCs (hematopoietic stem progenitor cells) were positively selected by paramagnetic iron-dextran particles directly conjugated to anti-CD34 monoclonal antibodies (CD34 MicroBead Kit, human, Miltenyi Biotec) by using an automatized system (MACS pro, Miltenyi Biotec). The HSPCs were counted using Malassez cells (Fastread, Biosigma) and their viability was assessed by trypan blue exclusion (Sigma Aldrich). The purity of all samples was checked by flow cytometry (BD FACS Canto II, BD Biosciences) with a specific CD34 fluorochrome-conjugated antibody (CD34APC, Miltenyi Biotec) and was superior to 90% for all samples used.

Erythroid liquid culture procedure

HSPCs were cultured in DMEM medium (Dulbecco's modified eagle Medium, Life technologies) containing 12% FCS (Life technologies), 1% BSA (Sigma Aldrich), 0.5 IU/mL rHu Epo (Retacrit™, Hospira), 50 ng/mL SCF (PeproTech), 40 ng/mL rHu IGF-1 (RD system), 1.10^{-6} mol/L dexamethasone (Sigma Aldrich) and 100µM of ammonium Fe^{3+} sulfate dodecahydrate (Sigma-Aldrich). They were incubated in 12-well plates at 37°C in a 5% carbon dioxide atmosphere for 10 days until they reached the basophilic erythroblast stage. At D10, the cells were placed in DMEM medium containing 15% FCS, 1% BSA with 300 mg/mL holotransferrin, 1 IU/mL rHu Epo, 1 IU/mL insulin (Sigma-Aldrich) and 100µM of Ammonium Fe^{3+} sulfate dodecahydrate for terminal erythroid differentiation until D14. Deferasirox (DFX) was supplied by Novartis. DFX was solubilized in pure dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). Three different conditions were tested: control (CTRL), DFX and DMSO as vehicle for DFX. DFX and DMSO were added at day 0 and day 10 of the cell culture procedure.

Functional assays

Cell proliferation was assessed by cell counting using Malassez cells. Apoptotic cells were determined by the percentage of Annexin V positive cells (FITC Annexin V, BD Biosciences) by flow cytometry, as per the manufacturer's intructions. Cell cycle was studied by DAPI staining (4',6-diamidino-2'-phylindole, dihydrochloride, 1mg/ml, Thermo SCIENTIFIC). Briefly, cells were permeabilized with commercial solution (Cytofix/cytoperm™, BD Biosciences). After washes with Permwash™ (BD Biosciences), cells were incubated with DAPI at room temperature for 1 hour. DNA content was evaluated by flow cytometry. All flow cytometry analyses were done on BD FACS Canto II.

Erythroid differentiation: flow cytometry and cytospins

Cells were collected at D5, D10 and D14 and stained with fluorochrome-conjugated antibodies for 30 minutes at room temperature. To analyze global erythroid differentiation, transferrin receptor (CD71-APC-AlexaFluor® 750, IOTest, Beckman Coulter) and glycophorin A (Glycophorin A-VioBlue, clone: REA175, Miltenyi Biotec) were used. Three populations are described: proerythroblasts CD71$^+$/CD235$^-$, basophilic erythroblasts CD71$^+$/CD235$^+$ and orthochromatic erythroblasts CD71$^-$/CD235$^+$. For cytospin preparation, $2x10^5$ cells in 200µL of PBS BSA 1% were put at D10 on coated slides, using the Thermo Scientific Cystopin 4. The slides were stained with May-Grunwald-Giemsa (MGG) by an automatized way (Aerospray®Pro, Elitech).

Assessment of intracellular ROS by flow cytometry

We measured intracellular ROS level using dihydroethidium (DHE, InvitrogenTM) and mitochondrial ROS level using a specific probe MitoSOX ([3,8-phenanthridinediamine, 5-(60-triphenylphosphoniumh exyl)-5,6 dihydro-6-phenyl]; Molecular Probes, Invitrogen). The results are given by ratio of fluorescence RFI.

Intracellular pathway: immunofluorescence microscopy assays and flow cytometry

For confocal microscopy, at D10, 1.10^5 cells permeabilized following the same protocol as for cell cycle. Cytospins were prepared, saturated with PBS BSA 2% during 45 min. For FOXO3a staining, incubation was done overnight at 4°C and with a dilution of 1/400 concentration for primary antibody (anti-human FOXO3A,

clone 3F12, Sigma Aldrich). After a wash with PBS, the secondary antibody (Alexa-fluor 647 donkey anti-mouse, Life technologies, Eugene, USA) was incubated during one hour at room temperature at dilution of 1/200. After an ultimate wash with PBS, 5µL of a mix of Vectashield ™ (Vector laboratories) with Dapi 1/2000 (DAPI antifade ES, Cytocell) was put on cells. Preparations were read on spinning disk confocal microscope (IMIC 2.0 Till Photonics, FEI, Munich) with a camera (iXon 897, EMCCD, Andor). Then data were analyzed with Icy software (http://icy.bioimageanalysis.org). The same procedure was done for NF-κB (p*NF-κB* p65, clone L8F6, Cell Signaling) with a dilution of 1/400 for primary antibody and 1/200 for the secondary antibody.

For flow cytometry, at D10, cells were permeabilized and stained with pAKT (pAKT, alexa 488, Cell Signaling), ERK (pErk 1/2, Alexa 647, Cell Signaling), pS6 ribosomal protein (pS6, Alexa 647, Cell Signaling) during overnight at 4°C and with a dilution of 1/50 and then analyzed by flow cytometry.

Clonogenic assays

At D5, cells were harvested and were cultured in 12-well plates with 500µL of MethoCultTM H4434 Classic (Stemcell Technologies) at concentration of $1x10^4$ cells per well. All conditions were done in duplicate. Colony forming unit erythroid (CFU-E) and the burst forming unit erythroid (BFU-E) were counted after 7 days and 14 days of culture respectively based on morphological classical criteria. An external technician to the team read the colonies in "double blind" condition.

NF-κB pathway-specific expression array

The human NF-κB signaling targets RT^2 Profiler PCR array kit (SABiosciences) was used to assess the impact of DFX on the expression of 84 genes target of NF-κB according to the manufacturer's instructions.

Intracellular iron measurements

Three millions of K562 cells were incubated for 48h with increasing doses of DFX (from 3 to 200µM) in the same medium as described above plus 100µM of ammonium Fe^{3+} citrate. Cells were lysed by heat shock in water and intracellular iron concentrations were determined by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) using a XSERIES 2 analyzer (Thermo Scientific).

IRP activity measurement

K562 cells were used to perform IRP activity measurement. Cells were cultured in the same conditions as for intracellular iron measurements with an increase dose of DFX. Total IRP RNA-binding activity was measured by electrophoretic mobility shift assays with 5 µg of total protein extracts. The minimal sequence of human ferritin H-chain Iron Responsive Element (IRE) was biotin-labeled with biotinylated cytidine (bis) phosphate using T4 RNA ligase (Thermo Scientific). The IRE-IRP reaction was carried out as previously described and the complexes were separated on non-denaturing 4% PAGE in 0.5X TBE, transferred onto Hybond™N^+ membrane (GE Healthcare) and the biotinylated bands were detected after interaction with the streptavidin-horseradish peroxidase conjugate by the peroxidase substrate for enhanced chemiluminescence (ECL)(GE Life Sciences). Quantitation of the signals was done with the Image J software (v1.47, Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

Oxidative stress metabolite measurements

Thiobarbituric acid reactive species include products of the oxidative degradation of polyunsaturated fatty acids, in particular MDA. We used the modified method of Ohkawa et al (Ohkawa, Anal Biochem, 1979), based on the reaction of aldehyde functions of MDA released by acid hydrolysis at 95°C with thiobarbituric acid forming a pink-colored complex quantified by fluorimetry. Carbonyl assay is based on the reaction of carbonyl groups in protein with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form 2,4-dinitrophenylhydrazone, which was estimated spectrophotometrically at 380 nm after trichloroacetic acid precipitation of proteins. Glutathione peroxidase activity was determined by the modified method of Gunzler using tertbutyl hydroperoxide as substrate (Gunzler, Chem Klin Biochem, 1974).

Total GSH (GSH + GSSG) was determined as described previously (Akerboom, Meth Enzymol, 1981) based on the spectrophotometric evaluation of the reduction rate of 5,50-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Sigma, France) into 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). Values were determined by comparing the reduction rate against a standard curve of GSH.

Cu-Zn superoxide dismutase activity (Cu-Zn SOD) was determined by monitoring the auto-oxidation of pyrogallol using the Marklund method (Marklund, Eur J Biochem, 1974).

Total SOD activity Corresponding to the activity of SOD1 (Cu-Zn SOD) and SOD2 (Mn SOD) was measured using an assay based on the competition between pyrogallol oxidation by ·O2 and superoxide dismutation by SOD. SOD2 activity was determined by assaying for SOD activity in the presence of sodium cyanide, which selectively inhibits SOD1 but not SOD2. SOD1 activity

was calculated by subtracting SOD2 activity from total SOD activity. The rate of auto-oxidation is taken from the increase in the absorbance at 420 nm.

Ferroptosis investigation

RT-qPCR: RNA was extracted using the *mir* Vana™ miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. 500 ng total RNA for each sample was used as input for each reverse transcription reaction, performed using the TaqMan RT kit (Applied Biosystems). Primer for IREB2, CS, ATP5G3, EMC2, ASCF2, RPL8 and GAPDH come from commercial solutions (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR reactions were performed using TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG (life technologies). Triplicate samples per condition were analyzed on a Stratagene Mx3000p qPCR instrument (Agilent Technologies). Differences in mRNA levels compared to GAPDH internal reference control were computed between control and experimental conditions using the ΔΔCt method.

Thioredoxin 1 and 2 knock down cell lines production

K562 cells were transfected by electroporation (Amaxa®Cell Line Nucleofector® Kit V K562, Lonza, Cologne) with Nucleofector II (Amaxa Biosystem, Lonza) with three different pEBV-based plasmids expressing shRNA sequences: one with an inefficient shRNA sequence widely documented in the literature and used as a control (CTL), one targeting the TRX1 gene (NM_003329; nucleotides 208 to 226) and one against TRX2 (NM_012473, nucleotides 195 to 213). These replicative pEBV-based plasmids imposed a stable and efficient knock down, as reported in the literature for numerous genes (Biard, Nucleic Acids Res, 2007). konck down cells were called $TRX1^{KD}$ and $TRX2^{KD}$ cells. All plasmids contain a resistance gene against hygromycin. Knock down phenotype was checked by Western blotting analyses. Twenty to forty µg of total proteins were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 8% gels, and proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The blots were saturated with 2% bovine serum albumin in TBS-Tween 0.2% and probed overnight at 4°C with antibodies against Trx1 (1:200, Santa Cruz), Trx2 (1:1000, Cell Signaling) or actin (1:250, Sigma Aldrich). Following three washes with TBS-Tween 0.2%, the blots were incubated with peroxidase-coupled goat anti-rabbit IgG (Bethyl) at a dilution of 1:5000 for 1 h at room temperature, followed by detection with the ECL reagent.

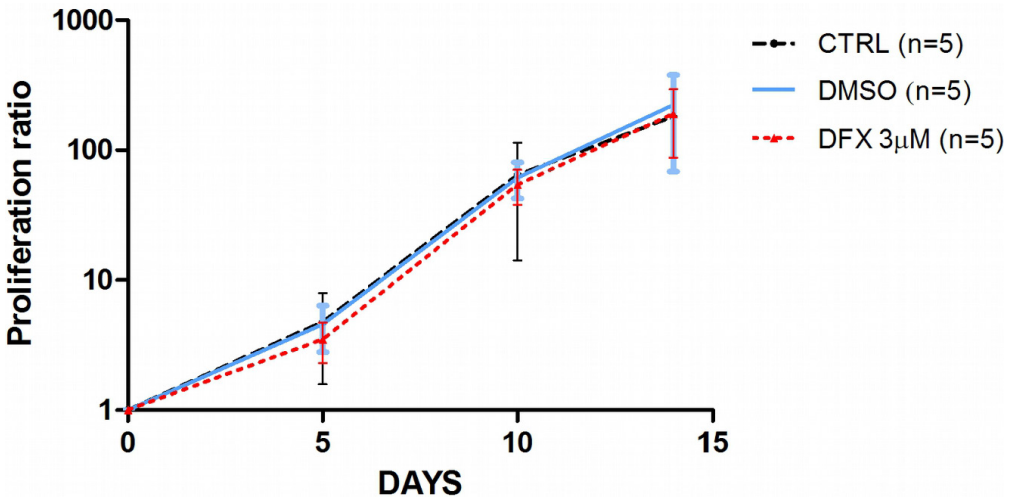
NFKB reporter assays

Activation of NF-κB was measured for the K562-Thioredoxin 1 and 2 knock down cell lines. These cells were transfected By nuclear electroporation (Amaxa®Cell Line Nucleofector® Kit V K562, Lonza with Nucleofector II Amaxa Biosystem) of two plasmids: pGL4.32[luc2P/NF-KB-RE/hygro] (ref E849A, Promega, Madison) and pGL4.75[hRluc/CMV] (ref 693A, Promega, Madison). Both plasmids contain a different luciferase activity. The first plasmid displays the firefly luciferase activity under the dependence of a NF-κB responsive element, whereas the second plasmid constitutively produces the renilla luciferase activity and was used as control of transfection. After nuclear electroporation, the cells were cultured in the same iron overloaded medium as described before with DFX 3µM or N-acetyl cysteine 1mM for 48 hours. Then the cells were harvested, washed and the number of cells and their viability was determined with a Luna™ automated cells counter (Logos Biosystems, Korea). Then luciferase activity was measured using the Dual-luciferase® reporter assay system (Promega, Madison) on a CLARIOstar plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) following the manufacturer's protocol. Each condition was read in duplicate. For each condition, the firefly luciferase activity was reported to the Renilla luciferase activity and the data were normalized with the number of cells.

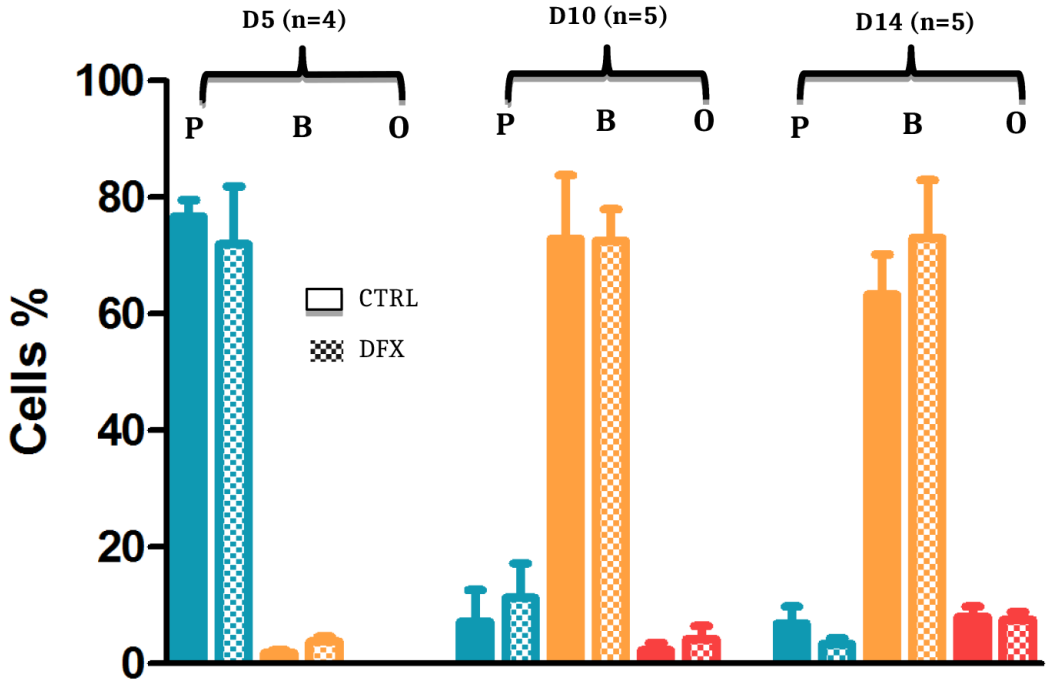
Next generation sequencing

Samples were studied by high-throughput sequencing (HTS) of 36 genes recurrently mutated in myeloid malignancies. This included genes encoding proteins involved in signal transduction (CBL [exons 8-9], CSF3R [exons 14-18], FLT3 [exon 20], JAK2 [exons 12 + 14], KIT [exons 8-11 + 17], KRAS [exons 2-3], MPL [exon 10], NRAS [exons 2-3], PTPN11 [exons 3 + 13], RIT1 [exon 5], SETBP1 [exon 4]), transcription (BCOR [exons 2-15], BCORL1 [exons 1-12], ETV6 [exons 1-8], GATA2 [exons 2-6], RUNX1 [exons 3-8]), chromatin modification (ASXL1 [exons 11-12], EZH2 [exons 2-20], DNA methylation (DNMT3A [exons 2-23], IDH1 [exon 4], IDH2 [exon 4], TET2 [exons 3-11]), RNA splicing (SF3B1 [exons 13-16], SRSF2 [exon 1], U2AF1 [exons 2 + 6], ZRSR2 [exons 1-11]), cohesin complex (NIPBL [exons 2-47], RAD21 [exons 2-14], SMC1A [exons 1-25], SMC3 [exons 1-29], STAG2 [exons 3-35]), tumor suppression (PHF6 [exons 2-10], TP53 [exons 3-11], WT1 [exons 7 + 9]] and other pathways [CALR [exon 9], NPM1 [exon 11]). Libraries were prepared using Ampliseq™ System according to the manufacturer's instructions and run on sequencing on Personal Genome Machine® (PGM,

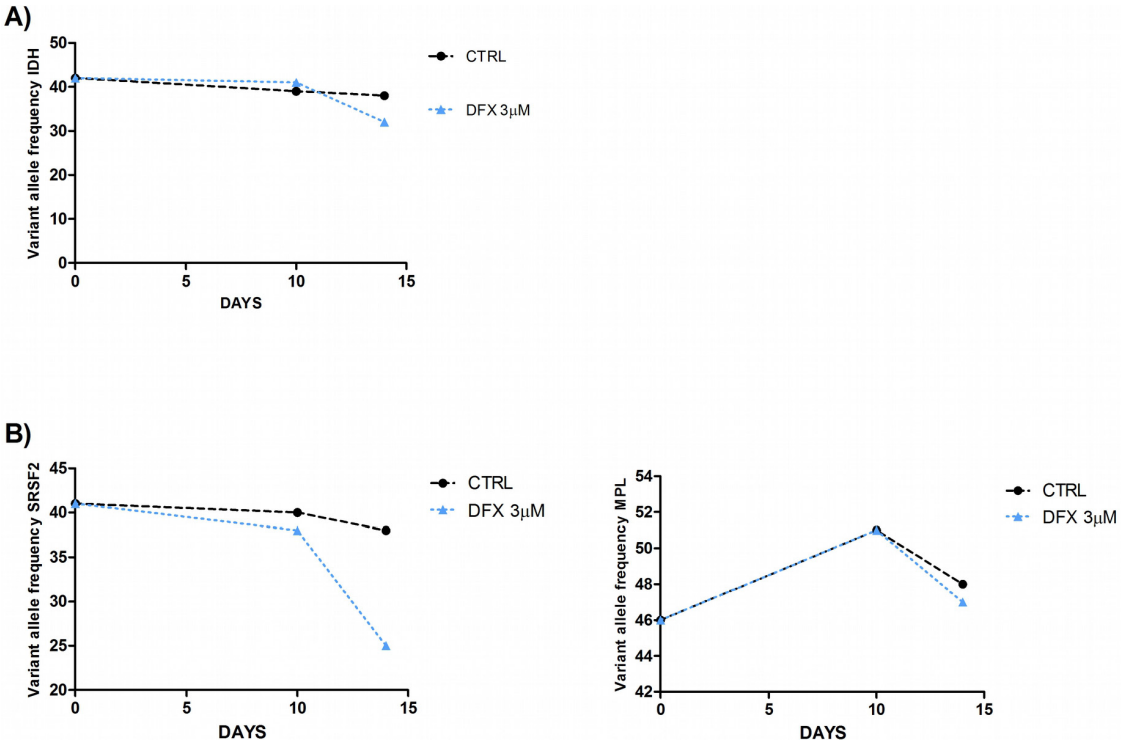
Life Technologies®). A high depth of coverage (>2000X) was obtained for all genes. Data were processed by Torrent Browser (Life Technologies®) and SeqNext (JSI Medical System®). Frameshift and nonsense variants were always considered as relevant mutations. Single nucleotide variants were retained in the absence of description into public databases of human polymorphisms and effects on protein function were predicted with established prediction tools (SIFT, PolyPhen-1, PolyPhen-2, MAPP, PhD-SNP and SNAP). Notably, because of technical limitations, the mutation c.1934dupG in ASXL1 cannot be detected with PGM sequencing justifying its systematic validation by Sanger sequencing as previously described (Duployez, Blood, 2016).



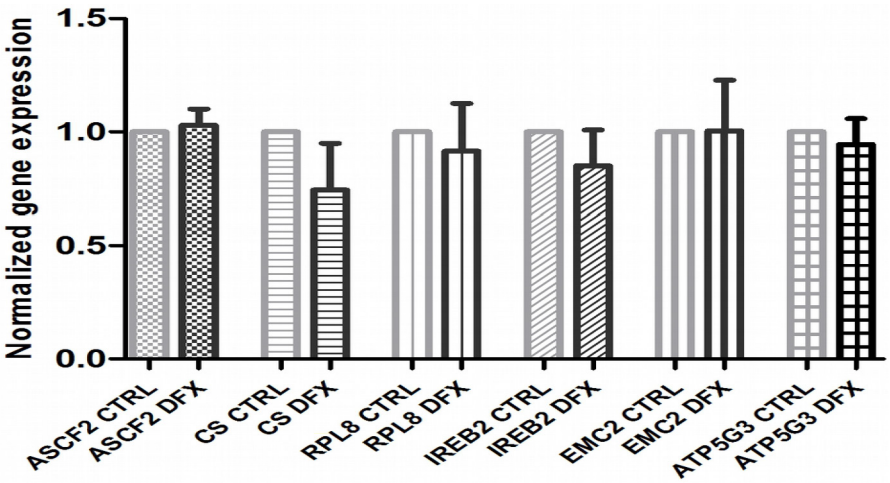
Supplementary Figure 1: Effect of low dose of deferasirox on 5 healthy donors CD34$^+$ cells. Proliferation rate of CD34$^+$ cells from healthy donors (n=5) treated with low dose of DFX in our erythroid differentiation model. There was no effect of DFX 3μM suggesting a specific role of low dose of deferasirox only on MDS samples.



Supplementary Figure 2: Effects of low dose DFX on erythroid differentiation. Global erythroid differentiation was studied by flow cytometry by monitoring three populations of cells: proerythroblasts (P) $CD71^{+}/CD235^{-}$, basophil erythroblasts (B) $CD71^{+}/CD235^{+}$ and orthochromatic erythroblasts (O) $CD71^{-}/CD235^{+}$ (filled bars: control cells; dotted bars: DFX-treated cells).



Supplementary Figure 3: Evolution of variant allele frequency. Evolution of variant allele frequency (VAF) concerning $CD34^{+}$ cells from 2 MDS patients. We applied the erythroid differentiation model and we have followed the VAF. The first patient harboring IDH1 gene mutation **(A)** and the second patient **(B)** two gene mutations: one in SRSF2 gene and the other in MPL gene.



Supplementary Figure 4: Ferroptosis investigation. Relative gene expression by RTqPCR for 6 genes known to be specifically activated in ferroptosis process (RPL8, IREB2, ATP5G3, CS, ASCF2 and EMC2) from 7 samples treated or not with DFX 3µM (p=ns).

3) Conclusion et perspective

Fort de ce rationnel biologique et devant les résultats encourageants obtenus sur la petite cohorte du CHU de Grenoble, un protocole national va bientôt débuter. Le protocole LODEFI est promu par la Délégation à la Recherche Clinique et à L'innovation (DRCI) du CHU Grenoble Alpes. C'est un essai de phase II multicentrique avec 17 centres du Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM). Il propose de tester l'effet de faible dose de déférasirox (3,5mg/Kg correspondant à 3µM in vitro) chez des patients porteurs d'un syndrome myélodysplasique de faible risque en échec primaire ou secondaire aux agents stimulant de l'érythropoïèse et non dépendant d'un support transfusionnel (moins de 2 transfusions de 2 culots globulaires par 2 mois évalués sur 4 mois). Trente-neuf patients sont à inclure. L'objectif principal sera d'évaluer l'efficacité d'une faible dose de DFX (3,5mg/kg/jour) sur la dépendance transfusionnelle à 12 mois. Les objectifs secondaires seront d'évaluer la tolérance clinique et biologique d'une faible dose DFX pendant 12 mois maximum et de décrire la consommation de soins des patients à 12 mois.

CONCLUSION GENERALE

Au travers de ce travail de thèse, nous avons pu montrer que la niche hématopoïétique joue un rôle important dans la physiopathogenèse des syndromes myélodysplasiques du fait de capacités de soutien moindre des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules stromales mésenchymateuses issues de patient SMD ont comme anomalie une sous-expression de la protéine DICER1 entrainant une dérégulation du miRnome du stroma médullaire SMD. Les mécanismes à l'origine de cette sous-expression ne sont toujours pas élucidés. Cependant la surexpression de 2 miR ciblant l'ARNm de DICER1 et significativement surexprimés dans les CSM SMD pourrait l'expliquer en partie. Les résultats qui seront obtenus avec les constructions luciférases (en aval de Dicer1) pourront apporter des réponses.

Par ailleurs, l'analyse du miRnome des cellules stromales mésenchymateuses a permis de mettre en évidence une surexpression du miR-486-5p au sein des CSM SMD. Ce dernier est véhiculé des CSM vers les cellules souches hématopoïétiques par les vésicules extracellulaires de petites tailles. Son implication dans le phénotype observé dans le modèle de co-incubation cellules $CD34^+$ et sEVs issues de CSM SMD est en cours d'investigation grâce aux études de séquençage d'ARNm provenant de cellules $CD34^+$ de sujets sains dans lesquelles le miR-486-5p a été surexprimé. Nous avons pu mettre en évidence les sEVs comme un des moyens de communication intercellulaire important entre les CSM et les CSH. En effet les sEVs issues de stroma SMD induisent une modification phénotypique des CSH normales qui pourraient approcher le phénotype observé chez les $CD34^+$ SMD : apoptose, plus de ROS et des lésions géniques.

Pour approfondir ce travail, il serait intéressant :

- De voir si les sEVs issues de stroma SMD sont suffisantes pour induire des lésions géniques retrouvées de manière récurrente dans les SMD. C'est ce que nous prévoyons de faire par une analyse de whole exome sequencing dans notre modèle de co-incubation CSH et sEVs.
- De voir si le stress oxydatif retrouvé dans les $CD34^+$ en présence de ces vésicules est lié à la dérégulation du miR-486-5p ou bien est dû au contenu protéique ou à d'autre miR transportés dans ces vésicules et donc de réaliser des analyses

transcriptomiques et protéomiques des vésicules extracellulaires issues des stroma SMD.

- De voir grâce à notre modèle in vivo, si dans un modèle de souris humanisées à partir de SMD de bas risque, on peut accélérer la leucémogenèse en injectant de façon répétée des exosomes issus de stroma médullaire de SMD de haut risque.

REFERENCES

1. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. Cancer. 2007;109(8):1536-42.

2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405. Epub 2016/04/14.

3. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114(5):937-51.

4. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. Biochem J. 2009;417(3):639-50.

5. Mauritzson N, Albin M, Rylander L, Billstrom R, Ahlgren T, Mikoczy Z, et al. Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. Leukemia. 2002;16(12):2366-78.

6. Duployez N, Lejeune S, Renneville A, Preudhomme C. Myelodysplastic syndromes and acute leukemia with genetic predispositions: a new challenge for hematologists. Expert Rev Hematol. 2016;9(12):1189-202.

7. Bejar R. Implications of molecular genetic diversity in myelodysplastic syndromes. Current opinion in hematology. 2017;24(2):73-8. Epub 2016/11/23.

8. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. The New England journal of medicine. 2011;365(15):1384-95. Epub 2011/10/15.

9. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature. 2011;478(7367):64-9. Epub 2011/09/13.

10. Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. The New England journal of medicine. 2012;366(12):1090-8. Epub 2012/03/16.

11. Mossner M, Jann JC, Wittig J, Nolte F, Fey S, Nowak V, et al. Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. Blood. 2016;128(9):1246-59. Epub 2016/06/09.

12. da Silva-Coelho P, Kroeze LI, Yoshida K, Koorenhof-Scheele TN, Knops R, van de Locht LT, et al. Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. Nature communications. 2017;8:15099. Epub 2017/04/22.

13. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. The New England journal of medicine. 2009;360(22):2289-301. Epub 2009/05/29.

14. Damm F, Chesnais V, Nagata Y, Yoshida K, Scourzic L, Okuno Y, et al. BCOR and BCORL1 mutations in myelodysplastic syndromes and related disorders. Blood. 2013;122(18):3169-77. Epub 2013/09/21.

15. Mazumdar C, Shen Y, Xavy S, Zhao F, Reinisch A, Li R, et al. Leukemia-Associated Cohesin Mutants Dominantly Enforce Stem Cell Programs and Impair Human Hematopoietic Progenitor Differentiation. Cell stem cell. 2015;17(6):675-88. Epub 2015/11/27.

16. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Jadersten M, Jansson M, et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. Blood. 2015;126(2):233-41. Epub 2015/05/10.

17. Lindsley RC. Uncoding the genetic heterogeneity of myelodysplastic syndrome. Hematology American Society of Hematology Education Program. 2017;2017(1):447-52. Epub 2017/12/10.

18. Makishima H, Jankowska AM, McDevitt MA, O'Keefe C, Dujardin S, Cazzolli H, et al. CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia. Blood. 2011;117(21):e198-206. Epub 2011/02/25.

19. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood. 1997;89(6):2079-88. Epub 1997/03/15.

20. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. Blood. 2012;120(12):2454-65. Epub 2012/06/29.

21. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2007;25(23):3503-10. Epub 2007/08/10.

22. Komrokji RS, Corrales-Yepez M, Al Ali N, Kharfan-Dabaja M, Padron E, Fields T, et al. Validation of the MD Anderson Prognostic Risk Model for patients with myelodysplastic syndrome. Cancer. 2012;118(10):2659-64. Epub 2011/10/01.

23. Platzbecker U, Symeonidis A, Oliva EN, Goede JS, Delforge M, Mayer J, et al. A phase 3 randomized placebo-controlled trial of darbepoetin alfa in patients with anemia and lower-risk myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2017;31(9):1944-50. Epub 2017/06/20.

24. Moyo V, Lefebvre P, Duh MS, Yektashenas B, Mundle S. Erythropoiesis-stimulating agents in the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. Annals of hematology. 2008;87(7):527-36. Epub 2008/03/21.

25. Park S, Grabar S, Kelaidi C, Beyne-Rauzy O, Picard F, Bardet V, et al. Predictive factors of response and survival in myelodysplastic syndrome treated with erythropoietin and G-CSF: the GFM experience. Blood. 2008;111(2):574-82. Epub 2007/10/18.

26. Kosmider O, Passet M, Santini V, Platzbecker U, Andrieu V, Zini G, et al. Are somatic mutations predictive of response to erythropoiesis stimulating agents in lower risk myelodysplastic syndromes? Haematologica. 2016;101(7):e280-3. Epub 2016/04/09.

27. Santini V, Schemenau J, Levis A, Balleari E, Sapena R, Ades L, et al. Can the revised IPSS predict response to erythropoietic-stimulating agents in patients with classical IPSS low or intermediate-1 MDS? Blood. 2013;122(13):2286-8. Epub 2013/09/28.

28. Jadersten M, Malcovati L, Dybedal I, Della Porta MG, Invernizzi R, Montgomery SM, et al. Erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor treatment associated with improved survival in myelodysplastic syndrome. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2008;26(21):3607-13. Epub 2008/06/19.

29. Fenaux P, Giagounidis A, Selleslag D, Beyne-Rauzy O, Mufti G, Mittelman M, et al. A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. Blood. 2011;118(14):3765-76. Epub 2011/07/15.

30. Santini V, Almeida A, Giagounidis A, Gropper S, Jonasova A, Vey N, et al. Randomized Phase III Study of Lenalidomide Versus Placebo in RBC Transfusion-Dependent Patients With Lower-Risk Non-del(5q) Myelodysplastic Syndromes and Ineligible for or Refractory to Erythropoiesis-Stimulating Agents. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2016;34(25):2988-96. Epub 2016/06/30.

31. Toma A, Kosmider O, Chevret S, Delaunay J, Stamatoullas A, Rose C, et al. Lenalidomide with or without erythropoietin in transfusion-dependent erythropoiesis-stimulating agent-refractory lower-risk MDS without 5q deletion. Leukemia. 2016;30(4):897-905. Epub 2015/10/27.

32. Koreth J, Pidala J, Perez WS, Deeg HJ, Garcia-Manero G, Malcovati L, et al. Role of reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in older patients with de novo myelodysplastic syndromes: an international collaborative decision analysis. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2013;31(21):2662-70. Epub 2013/06/26.

33. Park S, Hamel JF, Toma A, Kelaidi C, Thepot S, Campelo MD, et al. Outcome of Lower-Risk Patients With Myelodysplastic Syndromes Without 5q Deletion After Failure of Erythropoiesis-Stimulating Agents. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2017;35(14):1591-7. Epub 2017/03/30.

34. Marini B, Bassan R, Barbui T. Therapeutic efficacy of danazol in myelodysplastic syndromes. European journal of cancer & clinical oncology. 1988;24(9):1481-9. Epub 1988/09/01.

35. Kantarjian H, Fenaux P, Sekeres MA, Becker PS, Boruchov A, Bowen D, et al. Safety and efficacy of romiplostim in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome and thrombocytopenia.

Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010;28(3):437-44. Epub 2009/12/17.

36. Giagounidis A, Mufti GJ, Fenaux P, Sekeres MA, Szer J, Platzbecker U, et al. Results of a randomized, double-blind study of romiplostim versus placebo in patients with low/intermediate-1-risk myelodysplastic syndrome and thrombocytopenia. Cancer. 2014;120(12):1838-46. Epub 2014/04/08.

37. Mittelman M, Platzbecker U, Afanasyev B, Grosicki S, Wong RSM, Anagnostopoulos A, et al. Eltrombopag for advanced myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukaemia and severe thrombocytopenia (ASPIRE): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. The Lancet Haematology. 2018;5(1):e34-e43. Epub 2017/12/16.

38. Robin M, Porcher R, Ades L, Boissel N, Raffoux E, Xhaard A, et al. Matched unrelated or matched sibling donors result in comparable outcomes after non-myeloablative HSCT in patients with AML or MDS. Bone marrow transplantation. 2013;48(10):1296-301. Epub 2013/04/16.

39. Kroger N, Iacobelli S, Franke GN, Platzbecker U, Uddin R, Hubel K, et al. Dose-Reduced Versus Standard Conditioning Followed by Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Patients With Myelodysplastic Syndrome: A Prospective Randomized Phase III Study of the EBMT (RICMAC Trial). Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2017;35(19):2157-64. Epub 2017/05/04.

40. Cutler C. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for myelodysplastic syndrome. Hematology American Society of Hematology Education Program. 2010;2010:325-9. Epub 2011/01/18.

41. Damaj G, Duhamel A, Robin M, Beguin Y, Michallet M, Mohty M, et al. Impact of azacitidine before allogeneic stem-cell transplantation for myelodysplastic syndromes: a study by the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie-Cellulaire and the Groupe-Francophone des Myelodysplasies. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2012;30(36):4533-40. Epub 2012/10/31.

42. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2002;20(10):2429-40. Epub 2002/05/16.

43. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. The Lancet Oncology. 2009;10(3):223-32. Epub 2009/02/24.

44. Vey N, Prebet T, Thalamas C, Charbonnier A, Rey J, Kloos I, et al. Phase 1 dose-escalation study of oral abexinostat for the treatment of patients with relapsed/refractory higher-risk myelodysplastic syndromes, acute myeloid leukemia, or acute lymphoblastic leukemia. Leukemia & lymphoma. 2017;58(8):1880-6. Epub 2016/12/03.

45. Prebet T, Sun Z, Ketterling RP, Zeidan A, Greenberg P, Herman J, et al. Azacitidine with or without Entinostat for the treatment of therapy-related myeloid neoplasm: further results of the E1905 North American Leukemia Intergroup study. British journal of haematology. 2016;172(3):384-91. Epub 2015/11/19.

46. Faderl S, Garcia-Manero G, Estrov Z, Ravandi F, Borthakur G, Cortes JE, et al. Oral clofarabine in the treatment of patients with higher-risk myelodysplastic syndrome. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010;28(16):2755-60. Epub 2010/04/28.

47. Roberts DA, Wadleigh M, McDonnell AM, DeAngelo DJ, Stone RM, Steensma DP. Low efficacy and high mortality associated with clofarabine treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. Leukemia research. 2015;39(2):204-10. Epub 2015/01/03.

48. Jabbour E, Faderl S, Sasaki K, Kadia T, Daver N, Pemmaraju N, et al. Phase 2 study of low-dose clofarabine plus cytarabine for patients with higher-risk myelodysplastic syndrome who have relapsed or are refractory to hypomethylating agents. Cancer. 2017;123(4):629-37. Epub 2016/10/16.

49. Thepot S, Boehrer S, Seegers V, Prebet T, Beyne-Rauzy O, Wattel E, et al. A phase I/II trial of Erlotinib in higher risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia after azacitidine failure. Leukemia research. 2014;38(12):1430-4. Epub 2014/12/03.

50. Komrokji RS, Padron E, Yu D, Fulp WJ, Rodriguez Y, Tinsley S, et al. Phase II clinical study of erlotinib for treatment of myelodysplastic syndromes. American journal of hematology. 2014;89(8):809-12. Epub 2014/04/26.

51. Duong VH, Jaglal MV, Zhang L, Kale V, Lancet JE, Komrokji RS, et al. Phase II pilot study of oral dasatinib in patients with higher-risk myelodysplastic syndrome (MDS) who failed conventional therapy. Leukemia research. 2013;37(3):300-4. Epub 2013/01/01.

52. Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng QR, et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. Leukemia. 2014;28(6):1280-8. Epub 2013/11/26.

53. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G, Jabbour E. Therapeutic choices after hypomethylating agent resistance for myelodysplastic syndromes. Current opinion in hematology. 2017. Epub 2017/12/22.

54. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. Nature. 2014;505(7483):327-34.

55. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells. 1978;4(1-2):7-25.

56. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. J Cell Physiol. 1977;91(3):335-44.

57. Lord BI, Testa NG, Hendry JH. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. Blood. 1975;46(1):65-72.

58. Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. J Exp Med. 1994;179(5):1677-82.

59. Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. Blood. 1996;87(2):518-24.

60. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell. 2007;131(2):324-36. Epub 2007/10/25.

61. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. Immunity. 2006;25(6):977-88. Epub 2006/12/19.

62. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature. 2010;466(7308):829-34. Epub 2010/08/13.

63. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. Immunity. 2010;33(3):387-99. Epub 2010/09/21.

64. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. Nature. 2013;495(7440):231-5. Epub 2013/02/26.

65. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. Nature. 2012;481(7382):457-62. Epub 2012/01/28.

66. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

67. Lucas D, Scheiermann C, Chow A, Kunisaki Y, Bruns I, Barrick C, et al. Chemotherapy-induced bone marrow nerve injury impairs hematopoietic regeneration. Nature medicine. 2013;19(6):695-703. Epub 2013/05/07.

68. Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. Nature. 2008;452(7186):442-7. Epub 2008/02/08.

69. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, et al. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. Cell. 2011;147(5):1146-58. Epub 2011/11/29.

70. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Mendez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. The Journal of experimental medicine. 2011;208(2):261-71. Epub 2011/02/02.

71. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. Blood. 2010;116(23):4815-28. Epub 2010/08/18.

72. Hur J, Choi JI, Lee H, Nham P, Kim TW, Chae CW, et al. CD82/KAI1 Maintains the Dormancy of Long-Term Hematopoietic Stem Cells through Interaction with DARC-Expressing Macrophages. Cell stem cell. 2016;18(4):508-21. Epub 2016/03/22.

73. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. Nature. 2009;460(7252):259-63. Epub 2009/06/12.

74. Zhou BO, Yu H, Yue R, Zhao Z, Rios JJ, Naveiras O, et al. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. Nature cell biology. 2017;19(8):891-903. Epub 2017/07/18.

75. DiMascio L, Voermans C, Uqoezwa M, Duncan A, Lu D, Wu J, et al. Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. J Immunol. 2007;178(6):3511-20. Epub 2007/03/07.

76. Raza A, Gezer S, Mundle S, Gao XZ, Alvi S, Borok R, et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. Blood. 1995;86(1):268-76.

77. Tauro S, Hepburn MD, Peddie CM, Bowen DT, Pippard MJ. Functional disturbance of marrow stromal microenvironment in the myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2002;16(5):785-90.

78. Gersuk GM, Beckham C, Loken MR, Kiener P, Anderson JE, Farrand A, et al. A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. Br J Haematol. 1998;103(1):176-88.

79. Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, Yoshida S, Yamaguchi S, Takahashi M, et al. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia. 1997;11(12):2049-54.

80. Claessens YE, Bouscary D, Dupont JM, Picard F, Melle J, Gisselbrecht S, et al. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. Blood. 2002;99(5):1594-601. Epub 2002/02/28.

81. Kim M, Hwang S, Park K, Kim SY, Lee YK, Lee DS. Increased expression of interferon signaling genes in the bone marrow microenvironment of myelodysplastic syndromes. PloS one. 2015;10(3):e0120602. Epub 2015/03/25.

82. Claessens YE, Park S, Dubart-Kupperschmitt A, Mariot V, Garrido C, Chretien S, et al. Rescue of early-stage myelodysplastic syndrome-deriving erythroid precursors by the ectopic expression of a dominant-negative form of FADD. Blood. 2005;105(10):4035-42. Epub 2005/01/29.

83. Ferrer RA, Wobus M, List C, Wehner R, Schonefeldt C, Brocard B, et al. Mesenchymal stromal cells from patients with myelodyplastic syndrome display distinct functional alterations that are modulated by lenalidomide. Haematologica. 2013;98(11):1677-85. Epub 2013/05/30.

84. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutierrez-Espindola G, Perez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. Leukemia research. 2005;29(2):215-24. Epub 2004/12/21.

85. Varga G, Kiss J, Varkonyi J, Vas V, Farkas P, Paloczi K, et al. Inappropriate Notch activity and limited mesenchymal stem cell plasticity in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. Pathology oncology research : POR. 2007;13(4):311-9. Epub 2007/12/26.

86. Klaus M, Stavroulaki E, Kastrinaki MC, Fragioudaki P, Giannikou K, Psyllaki M, et al. Reserves, functional, immunoregulatory, and cytogenetic properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes. Stem cells and development. 2010;19(7):1043-54. Epub 2009/10/01.

87. Geyh S, Oz S, Cadeddu RP, Frobel J, Bruckner B, Kundgen A, et al. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. Leukemia. 2013;27(9):1841-51. Epub 2013/06/26.

88. Falconi G, Fabiani E, Fianchi L, Criscuolo M, Raffaelli CS, Bellesi S, et al. Impairment of PI3K/AKT and WNT/beta-catenin pathways in bone marrow mesenchymal stem cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes. Experimental hematology. 2016;44(1):75-83 e1-4. Epub 2015/11/02.

89. Aanei CM, Flandrin P, Eloae FZ, Carasevici E, Guyotat D, Wattel E, et al. Intrinsic growth deficiencies of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes. Stem cells and development. 2012;21(10):1604-15. Epub 2011/09/22.

90. Pavlaki K, Pontikoglou CG, Demetriadou A, Batsali AK, Damianaki A, Simantirakis E, et al. Impaired proliferative potential of bone marrow mesenchymal stromal cells in patients with myelodysplastic syndromes is associated with abnormal WNT signaling pathway. Stem cells and development. 2014;23(14):1568-81. Epub 2014/03/13.

91. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Flores-Guzman P, Gutierrez-Espindola G, Arana-Trejo RM, Castillo-Medina S, et al. Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. Leuk Res. 2008;32(9):1407-16.

92. Blau O, Baldus CD, Hofmann WK, Thiel G, Nolte F, Burmeister T, et al. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. Blood. 2011;118(20):5583-92.

93. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, Robledo C, Villaron EM, Hernandez-Campo P, et al. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. Leukemia. 2009;23(4):664-72.

94. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Rathinam CV, Luo N, et al. Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts. Nature. 2014;506(7487):240-4.

95. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. Nature. 2010;464(7290):852-7. Epub 2010/03/23.

96. Kennedy DS, Bester AJ, Heywood SM. The regulation of protein synthesis by translation control RNA. Biochemical and biophysical research communications. 1974;61(2):415-23. Epub 1974/11/27.

97. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97. Epub 2004/01/28.
98. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science. 2001;294(5543):853-8. Epub 2001/10/27.
99. Backes C, Fehlmann T, Kern F, Kehl T, Lenhof HP, Meese E, et al. miRCarta: a central repository for collecting miRNA candidates. Nucleic acids research. 2018;46(D1):D160-D7. Epub 2017/10/17.
100. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. Nature reviews Molecular cell biology. 2009;10(2):126-39. Epub 2009/01/24.
101. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. The EMBO journal. 2004;23(20):4051-60. Epub 2004/09/17.
102. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nature reviews Molecular cell biology. 2014;15(8):509-24. Epub 2014/07/17.
103. Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, Urbanowicz A, Tworak A, Mickiewicz A, et al. The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. Nucleic acids research. 2015;43(9):4365-80. Epub 2015/04/18.
104. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nature cell biology. 2009;11(3):228-34. Epub 2009/03/04.
105. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nature reviews Genetics. 2004;5(7):522-31. Epub 2004/06/24.
106. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. Molecular cell. 2007;27(1):91-105. Epub 2007/07/07.
107. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature. 2005;435(7043):834-8. Epub 2005/06/10.
108. Sokol L, Caceres G, Volinia S, Alder H, Nuovo GJ, Liu CG, et al. Identification of a risk dependent microRNA expression signature in myelodysplastic syndromes. British journal of haematology. 2011;153(1):24-32. Epub 2011/02/22.
109. Dostalova Merkerova M, Krejcik Z, Votavova H, Belickova M, Vasikova A, Cermak J. Distinctive microRNA expression profiles in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. European journal of human genetics : EJHG. 2011;19(3):313-9. Epub 2010/12/15.
110. Vasilatou D, Papageorgiou SG, Kontsioti F, Kontos CK, Tsiotra P, Mpakou V, et al. Expression analysis of mir-17-5p, mir-20a and let-7a microRNAs and their target proteins in CD34+ bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia research. 2013;37(3):251-8. Epub 2012/12/19.

111. Thol F, Scherr M, Kirchner A, Shahswar R, Battmer K, Kade S, et al. Clinical and functional implications of microRNA mutations in a cohort of 935 patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. Haematologica. 2015;100(4):e122-4. Epub 2015/01/02.

112. Jiang X, Hu C, Arnovitz S, Bugno J, Yu M, Zuo Z, et al. miR-22 has a potent anti-tumour role with therapeutic potential in acute myeloid leukaemia. Nature communications. 2016;7:11452. Epub 2016/04/27.

113. Solly F, Koering C, Mohamed AM, Maucort-Boulch D, Robert G, Auberger P, et al. An miRNA-DNMT1 Axis Is Involved in Azacitidine Resistance and Predicts Survival in Higher-Risk Myelodysplastic Syndrome and Low Blast Count Acute Myeloid Leukemia. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2017;23(12):3025-34. Epub 2016/11/25.

114. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). The Journal of biological chemistry. 1987;262(19):9412-20. Epub 1987/07/05.

115. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. Annual review of cell and developmental biology. 2014;30:255-89. Epub 2014/10/08.

116. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borras FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. Journal of extracellular vesicles. 2015;4:27066. Epub 2015/05/17.

117. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. The Journal of cell biology. 1985;101(3):942-8. Epub 1985/09/01.

118. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. Small GTPases. 2017;8(4):220-32. Epub 2016/08/06.

119. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nature reviews Molecular cell biology. 2018. Epub 2018/01/18.

120. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Current protocols in cell biology. 2006;Chapter 3:Unit 3 22. Epub 2008/01/30.

121. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. Journal of proteome research. 2008;7(12):5157-66. Epub 2009/04/16.

122. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016;113(8):E968-77. Epub 2016/02/10.

123. Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Yoshida M, Murata M, Murase K, et al. Extracellular vesicle miR-7977 is involved in hematopoietic dysfunction of mesenchymal stromal cells via poly(rC) binding protein 1 reduction in myeloid neoplasms. Haematologica. 2016;101(4):437-47. Epub 2016/01/24.

124. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. Science. 2004;303(5660):1007-10. Epub 2004/02/14.

125. Abounit S, Zurzolo C. Wiring through tunneling nanotubes--from electrical signals to organelle transfer. Journal of cell science. 2012;125(Pt 5):1089-98. Epub 2012/03/09.

126. Benard M, Schapman D, Lebon A, Monterroso B, Bellenger M, Le Foll F, et al. Structural and functional analysis of tunneling nanotubes (TnTs) using gCW STED and gconfocal approaches. Biology of the cell. 2015;107(11):419-25. Epub 2015/06/23.

127. Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, Purbhoo MA, Sowinski S, Hume AN, et al. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. J Immunol. 2006;177(12):8476-83. Epub 2006/12/05.

128. Moschoi R, Imbert V, Nebout M, Chiche J, Mary D, Prebet T, et al. Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. Blood. 2016;128(2):253-64. Epub 2016/06/04.

129. Marlein CR, Zaitseva L, Piddock RE, Robinson SD, Edwards DR, Shafat MS, et al. NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic blasts. Blood. 2017;130(14):1649-60. Epub 2017/07/25.

130. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. Nature. 1997;388(6641):482-8. Epub 1997/07/31.

131. Brasse-Lagnel C, Karim Z, Letteron P, Bekri S, Bado A, Beaumont C. Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. Gastroenterology. 2011;140(4):1261-71 e1. Epub 2011/01/05.

132. Delaby C, Pilard N, Goncalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. Blood. 2005;106(12):3979-84. Epub 2005/08/06.

133. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science. 2004;306(5704):2090-3. Epub 2004/10/30.

134. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. The Journal of clinical investigation. 2004;113(9):1271-6. Epub 2004/05/05.

135. Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. The American journal of clinical nutrition. 2017;106(Suppl 6):1559S-66S. Epub 2017/10/27.

136. Wilkinson N, Pantopoulos K. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. Frontiers in pharmacology. 2014;5:176. Epub 2014/08/15.

137. Pourcelot E, Lenon M, Mobilia N, Cahn JY, Arnaud J, Fanchon E, et al. Iron for proliferation of cell lines and hematopoietic progenitors: Nailing down the intracellular functional iron concentration. Biochimica et biophysica acta. 2015;1853(7):1596-605. Epub 2015/04/02.

138. Millonig G, Muckenthaler MU, Mueller S. Hyperferritinaemia-cataract syndrome: worldwide mutations and phenotype of an increasingly diagnosed genetic disorder. Human genomics. 2010;4(4):250-62. Epub 2010/06/01.

139. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. Free radical biology & medicine. 2014;66:75-87. Epub 2013/08/01.

140. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2003;329(1-2):23-38. Epub 2003/02/19.

141. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Archives of biochemistry and biophysics. 1986;246(2):501-14. Epub 1986/05/01.

142. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 2012;149(5):1060-72. Epub 2012/05/29.

143. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. Cell. 2014;156(1-2):317-31. Epub 2014/01/21.

144. Sanchez PV, Perry RL, Sarry JE, Perl AE, Murphy K, Swider CR, et al. A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. Leukemia. 2009;23(11):2109-17. Epub 2009/07/25.

145. Agliano A, Martin-Padura I, Mancuso P, Marighetti P, Rabascio C, Pruneri G, et al. Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. International journal of cancer. 2008;123(9):2222-7. Epub 2008/08/09.

146. Suragani RN, Cadena SM, Cawley SM, Sako D, Mitchell D, Li R, et al. Transforming growth factor-beta superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. Nature medicine. 2014;20(4):408-14. Epub 2014/03/25.

147. Chung YJ, Robert C, Gough SM, Rassool FV, Aplan PD. Oxidative stress leads to increased mutation frequency in a murine model of myelodysplastic syndrome. Leukemia research. 2014;38(1):95-102. Epub 2013/08/21.

148. Novotna B, Bagryantseva Y, Siskova M, Neuwirtova R. Oxidative DNA damage in bone marrow cells of patients with low-risk myelodysplastic syndrome. Leukemia research. 2009;33(2):340-3. Epub 2008/08/09.

149. Peddie CM, Wolf CR, McLellan LI, Collins AR, Bowen DT. Oxidative DNA damage in CD34+ myelodysplastic cells is associated with intracellular redox changes and elevated plasma tumour necrosis factor-alpha concentration. British journal of haematology. 1997;99(3):625-31. Epub 1997/12/24.

150. Kikuchi S, Kobune M, Iyama S, Sato T, Murase K, Kawano Y, et al. Improvement of iron-mediated oxidative DNA damage in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndrome by treatment with deferasirox. Free radical biology & medicine. 2012;53(4):643-8. Epub 2012/06/19.

RESUME

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont dus à une atteinte oligoclonale de la cellule souche hématopoïétique aboutissant à une dysplasie des lignées myéloïdes, des cytopénies sanguines et une évolution fréquente vers la leucémie aiguë. De nombreuses mutations décrites dans des gènes contrôlant la régulation épigénétique sont responsables de la genèse des SMD. Mais des travaux récents montrent également que des anomalies du microenvironnement médullaire, notamment des cellules stromales mésenchymateuses (CSM), peuvent induire et propager un SMD suggérant l'idée d'une communication intercellulaire étroite entre la niche et les cellules hématopoïétiques. L'invalidation du gène *Dicer1* (RNASE de type III impliquée dans le processing des microARN) dans les progéniteurs ostéoblastiques murins induit un véritable SMD avec dysmyélopoïèse.

Nous avons confirmé la sous-expression de DICER1 dans les CSM SMD à partir de prélèvements primaires de moelle totale et dans les CSM en expansion. Cette sous-expression de DICER1 s'accompagne d'une dérégulation du profil des microARN au sein de CSM SMD mise en évidence par étude transcriptomique des CSM SMD vs CSM témoins. Nous avons découvert une possible cible thérapeutique : le miR-486-5p que nous avons retrouvé constamment surexprimé dans les CSM SMD. Un des moyens pour les CSM d'influer sur les cellules souches hématopoïétiques peut se faire par la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs). Ces EVs sont hétérogènes et peuvent être définies par leur taille. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux petites vésicules extracellulaires (sEVs) contenant la fraction exosomale qui est connue comme pouvant transporter des microARN, ARNm et des protéines entre les cellules. Nous avons retrouvé ce miR-486-5p transporté comme cargo dans les sEVs sécrétées des CSM vers les $CD34^+$. De plus, nous montrons dans un modèle de co-incubation (sEVs avec $CD34^+$ de sujets sains), que sur le plan fonctionnel, les sEVs provenant de CSM SMD induisent plus d'apoptose, plus de stress oxydatif ainsi que plus de dommages à l'ADN.

Nous avons utilisé les propriétés du microenvironnement médullaire pour établir un modèle murin de SMD humain. En effet, la relative incapacité des cellules souches myélodysplasiques humaines de greffer et de reconstituer une hématopoïèse pathologique dans des souris immunodéprimées suggère que ces cellules souches SMD doivent avoir besoin d'un support extrinsèque du microenvironnement. Nous avons réalisé un modèle de souris humanisées en co-injectant des CSM et des $CD34^+$ en intratibial. Une prise de greffe a été observée chez toutes les souris injectées et nous avons pu étudier l'évolution clonale au fil des générations dans les différentes sous-populations de progéniteurs myéloïdes (common myeloid progenitors (CMP), granulocyte-macrophage progenitors (GMP) and megakaryocyte–erythroid progenitor (MEP)). Notre modèle est stable au cours des générations avec persistance du clone fondateur initial.

Par ailleurs, la surcharge martiale observée chez les patients SMD (souvent secondaire aux transfusions de culots globulaires) est également responsable d'un stress oxydatif. Le déférasirox (DFX), un chélaleur de fer, a montré dans le cadre d'études rétrospectives une amélioration de l'érythropoïèse chez des patients SMD. Grâce à un modèle de différenciation érythroïde avec surcharge martiale, nous avons montré que de faibles doses de DFX induisent une meilleure prolifération des progéniteurs érythroïdes (moins d'apoptose et plus de cellules en cycle) via une activation de NF-κB. Cette activation est due à une diminution du niveau de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) en rapport avec une diminution du fer labile et est contrôlée de manière très fine par le niveau de ROS.

En conclusion, ce travail confirme le rôle prépondérant du microenvironnement médullaire dans la genèse et la physiopathologie des syndromes myélodysplasiques et ouvre la voie à de nouvelles possibilités thérapeutiques.

Mots clefs : Syndrome myélodysplasique, microenvironnement, DICER1, microARN, vésicules extracellulaires, stress oxydatif, déférasirox.