



HAL
open science

Modélisation de la leucémie myelomonocytaire chronique par reprogrammation de cellules de patients.

Allan Beke

► **To cite this version:**

Allan Beke. Modélisation de la leucémie myelomonocytaire chronique par reprogrammation de cellules de patients.. Hématologie. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS494 . tel-02426238v1

HAL Id: tel-02426238

<https://theses.hal.science/tel-02426238v1>

Submitted on 2 Jan 2020 (v1), last revised 29 Jan 2020 (v2)

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.

Modélisation de la leucémie myélomonocytaire chronique par reprogrammation de cellules de patients

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°582 : **Cancérologie : Biologie - Médecine -
Santé (CBMS)**
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 29/11/17, par

M. Allan Beke

Composition du Jury :

Mme Michaela Fontenay Professeure, Institut Cochin (– U1016-UMR8104)	Présidente
M. Frédéric Rieux-Laucat Directeur de recherche, Institut Imagine (– UMR_S1163)	Rapporteur
M. Raphaël Itzykson Maître de conférences, Hôpital Saint-Antoine (– UMR7212/944)	Rapporteur
Mme Hélène Cavé Professeure, Hôpital Robert Debré (– UMR_S1131)	Examinatrice
M. Jean-Baptiste Micol Docteur, Gustave Roussy (– UMR1170)	Examineur
M. Éric Solary Professeur, Gustave Roussy (– UMR1170)	Directeur de thèse
M. Jean-Luc Villeval Directeur de recherche, INSERM (– UMR1170)	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite remercier **l'ensemble des membres du jury** ainsi que mes **deux directeurs de thèse** pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture critique de cette thèse.

Je remercie le **Pr. Michaela Fontenay** d'avoir accepté d'être présidente du Jury et merci pour le temps que vous m'avez consacré lors d'une réunion dans votre laboratoire.

Je remercie le **Dr. Raphael Itzykson** de m'avoir permis d'assister à l'une de ses consultations, d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et d'avoir apporté des corrections à mon manuscrit. A Gustave Roussy, dans l'équipe d'Eric Solary, tu es une légende.

Je remercie le **Dr. Frédéric Rieux-Laucat** d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Je remercie le **Pr. Hélène Cavé** d'avoir accepté d'être examinatrice dans le jury.

Je remercie le **Dr. Jean-Baptiste Micol** d'avoir accepté d'être examinateur. J'ai beaucoup apprécié notre rencontre aux journées de l'école doctorale de Roscoff.

J'adresse un remerciement spécial au **Pr. Eric Solary** qui m'a accueilli dans son équipe. Malgré des débuts difficiles, un milieu ardu et une fin sur les chapeaux de roues, je peux affirmer que tu as été un élément indispensable à la construction de ma personnalité et que tu m'as apporté une vision différente sur la recherche. Je te remercie sincèrement du fond du cœur.

Je tiens à remercier le **Dr. Jean-Luc Villeval** pour son aide sur le début de ma thèse et sa bonne humeur quotidienne.

Je remercie chaleureusement le **Dr. William Vainchenker** pour l'ensemble des discussions sur l'état de la recherche en France et à Gustave Roussy au détour d'un couloir. Lucie et moi avons particulièrement apprécié le fait de parler de tout et de rien dans notre bureau avec un puits de savoir et de connaissances comme vous.

Je remercie énormément le **Dr. Nathalie Droin** pour son aide globale et son expertise stupéfiante sur la génomique tout au long de cette thèse allant de la création des diverses amorces à son expertise sur le *RNAsequencing*.

Je remercie **Julie Rivière** pour son aide inestimable et indispensable à l'aboutissement de la génération des divers lignées iPS SRSF2^{P95H} qui n'a pas été une chose facile... Julie a permis la génération de ces lignées par son expertise inégalable dans la manipulation des outils de « gene editing », la transfection, les divers techniques de mutations ciblées, les tests de mycoplasmes... Malgré mon côté *je-m'en-foutisme* et *notre manque* de communication qui ont généré de nombreuses frictions, j'estime ton point de vue scientifique.

Je remercie chaleureusement le **Dr. Véronique Saada** pour son aide à l'identification des différentes populations de cellules triées sur lames après coloration MGG. Merci pour le repas que tu as organisé qui a été extraordinaire. Je te remercie sincèrement pour ta gentillesse qui est inégalable et qui me manquera à l'avenir.

Je remercie **Philippe Rameau** pour avoir eu la patience de me transmettre une partie infinitésimale de son savoir sur le fonctionnement des cytomètres et trieurs. Nos discussions sur tout et n'importe quoi et ta gentillesse m'ont été d'une grande aide lors de ma 3^{ème} et 4^{ème} année de

thèse.

Je remercie la responsable de la Plateforme d'Imagerie et de Cytométrie, le **Dr. Corinne Laplace-Builhé** pour m'avoir permis d'utiliser ses machines sans la présence de Philippe Rameau.

Un grand merci à l'ensemble des personnes qui ont travaillé à la plateforme iPS, **Philippe Langlois, Larissa Lordier, Sagana sachchithanantham, Cyriane Ouevray** dont le responsable le Dr. **William Vainchenker** et encore une fois.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe d'**Eric Solary** :

- Le **Dr. Laura Bencheikh, Margot Morabito, le Dr. Dorothée Selimoglu Buet, Séverine Badel, le Dr. Franck Debeurme, Catherine Lacout, le Dr. Lucie Laplane, Chloe Jégo**
- Le **Dr. Françoise Porteu, Richard Dyunga, le Dr. Emilie Elvira-Matlot, le Dr. Muriel Gaudry, Frank Ling.**
- Le **Dr. Fawzia Louache, le Dr. Yanyan Zhang, le Dr. Mallorie Mangan,**

Un remerciement immense à mes deux collègues de bureau à droite comme à gauche que j'ai nommé **Dr. Franck Debeurme, Dr. Francky, et Catherine Lacout**, fraîchement retraitée.

Tout d'abord **Francky**, j'ai particulièrement apprécié nos discussions sur nos projets respectifs, ô toi le maître de la destruction des projets, ainsi que ton aide aussi diverse et variée, sur l'écriture du manuscrit ou l'utilisation de PRISM.

Catherine, je te remercie pour les histoires que tu nous as conté sur les origines du laboratoire etc. Au risque de répéter ce que les personnes ont dit lors de ton pot de départ, où j'ai particulièrement apprécié le discours de William et Jean-Luc, tu as tout vu de la recherche depuis 40 ans et c'est une réelle perte au niveau scientifique et humain que tu t'en ailles. Je te souhaite beaucoup de plaisir lors de ta retraite.

Un remerciement au **Dr. Lucie Laplane** qui a été une découverte surprenante et indispensable à la construction de ma thèse. Sans toi cette thèse aurait été bien plus difficile. Tu m'as été d'une aide incommensurable sur tant de domaines : la participation à mon premier congrès internationale à Montréal, l'écriture de notre première revue où tu m'as appris à écrire, la réflexion scientifique de manière générale, sur le côté humain, sur ta participation à générer un esprit d'équipe au travers des repas chez Eric... Ceci est une liste non-exhaustive des choses que tu m'as apportés indirectement ou directement.

Un remerciement spécial au **Dr. Patrick Poncet** qui a été un père spirituel pour moi tout au long de ma vie universitaire. Patrick tu es une personne exceptionnelle et je suis particulièrement heureux d'avoir pu créer un lien avec toi. Je pense que je ne pourrai jamais te rendre la pareille. Une phrase, que nous apprécions particulièrement tous les deux, qui pourrait symboliser notre mantra serait cette fameuse phrase de Chateaubriand "Il faut être économe de son mépris étant donné le grand nombre des nécessiteux".

Je remercie infiniment **Cyriane Ouevray** pour son aide et son amitié durant cette année charnière qui est la 4^{ème} année de thèse. Tu as su acquérir un ensemble de compétences et de savoir qui t'ont permis de t'améliorer très rapidement. J'espère que nous pourrons toujours refaire des soirées ou des sorties ensemble. Je tiens à te féliciter pour ton dévouement au travail, ton envie d'apprendre inébranlable et ton aide précieuse.

Je remercie **Chloé Jégo** pour son aide précieuse durant cette 4^{ème} année de thèse. Merci de m'avoir aidé pour l'analyse Excel des quelques 1000-1500 fichier FACS, m'avoir aidé à faire entre

100 à 150 méthyles en parallèle avec moi et bien d'autres petites expériences de ce type-là. J'espère que tes dernières années de thèse seront plus agréables pour toi que cette première année. Tu as aussi été une oreille attentive durant ma thèse et je t'en remercie.

I would also like to thank ≈**Dr. Ana Hurtado** for all her help during my 3th year of my Ph.D. I appreciated the whole time we spent together during your internship in France. I regret one thing, we didn't hang out so much... I sincerely hope we can spend more time together in the future in another city for work or holidays. I know I didn't send you a lot of news but I can tell you one thing, you were/you are one of the best people that I met in a while.

Je remercie ma petite **Yanès Pelinski** pour sa bonne humeur constante et invariable au cours des heures de la journée. En revanche, est-ce que tu pourrais me rendre la chemise que tu as pris chez moi ? Une argentine pas comme les autres.

Je remercie **Gayathri Yogarajah** pour son aide sur le comptage des foci $\gamma H2AX$ et nos discussions dans la pièce du *Chill*.

Je remercie le **Dr. Mael Heiblig** pour toutes nos discussions médicales et amicales. On se refera des soirées où tu dois rentrer à 00h MAXIMUM. Superbe rencontre de fin de thèse.

Je remercie **Alessandro Donada**, un lecteur acharné de la bibliographie, un italien nerveux, un rugbyman prêt à faire une mêlée à 4h du matin avec 4g d'alcool dans chaque bras en haut d'un immeuble. Nos débats acharnés sur la recherche ainsi que tes conseils m'ont été très utiles. Merci. Je finirai par un petit : « E dommaggioooooo ».

Je remercie **Matthieu Mosca**, maître de la PCR, maître incontesté de la qPCR, le générateur de résultats, l'homme aux milles Western.

Je remercie **Stefania Mazzi** pour les quelques crises de fous rires que tu as déclenchées en parlant avec Alessandro...

Je remercie le **Dr. Nolwenn Lucas** pour sa « bonne humeur bretonne ». Je te laisse avec un petit dicton breton : « En Bretagne, c'est facile de savoir si l'été est enfin là : la pluie devient plus chaude. »

Je remercie le **Dr. Stephanie Solier** pour nos discussions et ton aide sur la plateforme d'imagerie. Je resterai un petit *Bean* à tout jamais.

Je remercie le **Dr. Christophe Willekens (Captain)**, je te souhaite beaucoup de courage pour rester IMPASSIBLE lors de tes 3 prochaines années de souffrance et de dépression. Je te remercie d'avoir accepté que je t'accompagne en consultation et du temps que tu m'as consacré.

Je remercie le **Dr. Marie Cambot** pour l'ensemble de nos discussions dans le couloir. J'attends avec impatience ton invitation pour faire de l'escalade avec toi et Pablo. Je te remercie aussi de m'avoir permis de passer une matinée en consultation avec le Pr. Pablo à l'hôpital.

Je remercie le **Dr. Najet Debili** pour sa bonne humeur et son comique de répétition à m'enfermer dans mon bureau tous les soirs. Je te remercie aussi pour m'avoir donné la recette secrète des liposomes qui se transmet de génération en génération au sein de ton équipe. C'est bientôt la retraite Najet, il va falloir que tu nous dises où tu as caché toutes les cytokines et la BSA (qui est du

commun d'ailleurs...) ...

Je remercie **Delphine Muller** pour son aide précieuse sur la fabrication des liposomes et de la BSA.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe du **Dr. Hana Raslova** : le **Dr. Isabelle Plo**, le **Dr. Caroline Marty**, le **Dr. Antonio Di Stefano**, **Nathalie Balayn**, le **Dr. Hind Bouzid**, le **Dr. Isabelle Godin**, le **Dr. Ileana Anthony-Debré**, le **Dr. Lamia Lamrani**, le **Dr. Monika Wittner**, le **Dr. Valérie Edmond**, le **Dr. Lise Secardin**.

Je remercie **les membres du comité scientifique de la fondation ARC** d'avoir financé ma 4^{ème} année de thèse qui m'a permis de finir de développer l'article sur la modélisation de la leucémie myélomonocytaire chronique.

I also thank the **Associate Professor Mrinal Patnaik** of the Rochester Mayo Clinic for his kindness, our discussions about my project, and our night out to discover Paris by night together after the Eric's apéritif-dining. I would be glad to meet you again in the USA after my Ph.D defense for the work or just another night out to discover Rochester by night.

Un énorme remerciement à tout le service de la D.A.R.I, anciennement S.A.I.C, de l'Université Paris-Sud avec deux remerciements spéciaux à deux personnes que j'apprécie et estime énormément.

Tout d'abord, un gigantesque remerciement au **Dr. Marie-Aude Richard** qui est une perle dans la valorisation de la recherche à l'Université Paris-Sud Saclay. Marie-Aude je te remercie de m'avoir pris sous ton aile durant ses deux années de dur labeur où tu m'en as fait baver et voir de toutes les couleurs. Grâce à toi, je ressors grandi et satisfait d'avoir travaillé avec/pour toi.

Et pour finir, un immense merci à **Soizic Lefeuvre**, Responsable de la valorisation et du partenariat et Adjointe de la D.A.R.I. à l'Université Paris-Sud. Merci pour ton soutien et l'ensemble de tes conseils durant mes années dans ton service. Je suis particulièrement heureux d'avoir pu travailler avec toi et Marie-Aude.

J'adresse mes remerciements à ma stagiaire **Apolline Chabenat** pour son aide lors de ma 2^{ème} année de thèse. Bientôt ce sera ton tour, jeune padawan.

Je remercie **Nathalie Bruneau** pour tout le soutien et l'affection qu'elle m'a apporté durant ma thèse. Ce ne fût pas simple mais tu as réussi à m'aider dans les moments durs grâce à tes multiples attentions.

Pour finir cette pluie de remerciements, j'aimerais remercier de tout mon cœur mes deux parents, **Jean-Marie Beke** et **Patricia Beke** et ma sœur, **Joannie Beke**. Votre aide et votre soutien indéfectible m'ont été d'un grand réconfort tout au long de cette thèse.

Et merci à tous ceux qui veulent être remerciés.

Je finirais ces remerciements par un magnifique poème de Charles Baudelaire « L'Horloge » représentant le temps passé entre les murs de ce laboratoire :

L'Horloge

Horloge! dieu sinistre, effrayant, impassible,
Dont le doigt nous menace et nous dit: "*Souviens-toi!*
Les vibrantes Douleurs dans ton coeur plein d'effroi
Se planteront bientôt comme dans une cible;

Le Plaisir vaporeux fuira vers l'horizon
Ainsi qu'une sylphide au fond de la coulisse;
Chaque instant te dévore un morceau du délice
A chaque homme accordé pour toute sa saison.

Trois mille six cents fois par heure, la Seconde
Chuchote : *Souviens-toi!* - Rapide, avec sa voix
D'insecte, Maintenant dit Je suis Autrefois,
Et j'ai pompé ta vie avec ma trompe immonde!

Remember! Souviens-toi! prodigue! *Esto memor!*
(Mon gosier de métal parle toutes les langues)
Les minutes, mortel folâtre, sont des gangues
Qu'il ne faut pas lâcher sans en extraire l'or!

Souviens-toi que le Temps est un joueur avide
Qui gagne sans tricher, à tout coup! c'est la loi
Le jour décroît; la nuit augmente, *souviens-toi!*
Le gouffre a toujours soif; la clepsydre se vide.

Tantôt sonnera l'heure où le divin Hasard,
Où l'auguste Vertu, ton épouse encore vierge,
Où le Repentir même (oh! la dernière auberge!),
Où tout te dira Meurs, vieux lâche! il est trop tard!"

— Charles Baudelaire, Les fleurs du mal, 1857.

Table des matières

TABLE DES FIGURES	I
LISTE DES ABREVIATIONS	II
CHAPITRE I : INTRODUCTION	- 1 -
PREAMBULE	- 2 -
I. LE SYSTEME HEMATOPOÏÉTIQUE	- 3 -
I. 1. Le modèle hiérarchique traditionnel.....	- 3 -
I. 2. Le modèle de hiérarchie à deux niveaux.....	- 5 -
I. 3 Le modèle CLOUD-HSPC.....	- 6 -
I. 4 Le modèle de perte égale de potentiel	- 7 -
II. LA LEUCEMIE MYELOMONOCYTAIRE CHRONIQUE	- 8 -
II. 1. Les hémopathies myéloïdes.....	- 8 -
II. 1. 1. Les syndromes myéloprolifératifs (ou néoplasmes myéloprolifératifs)	- 10 -
II. 1. 2. Les syndromes myélodysplasiques	- 13 -
II. 1. 3. Les leucémies aiguës myéloïdes	- 15 -
II. 1. 4 Les syndromes myélodysplasiques / myéloprolifératifs	- 17 -
II. 2 Caractéristiques cliniques	- 20 -
II. 3 Génétique	- 23 -
II. 4. 1 SRSF2	- 25 -
II. 4. 1 KRAS.....	- 30 -
II. 5 Evolution clonale	- 31 -
II. 6 Modèles.....	- 36 -
II. 7 Approches thérapeutiques.....	- 37 -
III. LES CELLULES PLURIPOTENTES INDUITES	- 40 -
III. 1. La différenciation hématopoïétique	- 41 -
III. 2. Modélisation des hémopathies myéloïdes	- 46 -
III. 3. Laplane L., Beke A., Vainchenker W. et Solary E., Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells as New Model Systems in Oncology, Stem Cells, 2015	- 49 -
III. 4. Lucie Laplane & Allan Beke., What Can We Learn From Stem Cells? Induced Pluripotent Stem Cells As models In Cancer, oral presentation, ISHPSSB Montréal, 2015.....	- 55 -
IV. OBJECTIFS	- 56 -
CHAPITRE II : RESULTATS	- 57 -
Abstract	- 59 -
Highlights.....	- 59 -
Graphical abstract	- 60 -
Introduction.....	- 61 -
Patient and methods.....	- 62 -
Results	- 70 -
Discussion	Erreur ! Le signet n'est pas défini.
Figure legends	- 78 -
SUPPLEMENTAL MATERIAL	- 90 -
CHAPITRE III : DISCUSSION	- 104 -
Les mutations du gène TET2 n'interdisent pas la reprogrammation des cellules hématopoïétiques	- 105 -
La reprogrammation des cellules CD34 ⁺ de patients atteints de LMMC capture une partie de l'hétérogénéité génétique de la maladie	- 108 -
Le maintien en culture de cellules leucémiques porteuses de mutations des gènes d'épissage s'avère délicat. -	- 110 -
-	-
Les clones reproduisent les caractéristiques de la maladie du patient.	- 113 -
L'hétérogénéité fonctionnelle et épigénétique ne reflète pas la seule hétérogénéité génétique	- 115 -
L'introduction de la mutation SRSF2 ^{P95H} dans les cellules du patient A modifie le phénotype.....	- 117 -
Les agents hypométhylants ont un effet direct sur les cellules du clone leucémique	- 118 -
L'analyse des clones de cellules reprogrammées devrait permettre d'explorer une partie des facteurs extrinsèques contribuant à l'évolution du clone leucémique.....	- 120 -
BIBLIOGRAPHIE	- 123 -

Table des figures

Figure 1 : Système hématopoïétique de Weissman (2010)	p.3
Figure 2 : Système hématopoïétique de Pappenheim (1905)	p.4
Figure 3 : Système hématopoïétique de Dick (2016)	p.5
Figure 4 : Système hématopoïétique de Steinmetz (2017)	p.6
Figure 5 : Système hématopoïétique de Duffy (2014)	p.7
Figure 6 : Représentation en 3D des différentes hémopathies myéloïdes	p.9
Figure 7 : Représentation graphique de l'âge de diagnostic, ratio sexuelle ainsi que de la mortalité selon les différentes hémopathies myéloïdes	p.10
Figure 8 : Courbe de la survie des différents syndromes myéloprolifératifs	p.11
Figure 9 : Représentation graphique des différents gènes retrouvés mutés dans les syndromes myéloprolifératifs	p.12
Figure 10 : Courbe de la survie des différents syndromes myélodysplasiques	p.14
Figure 11 : Photos des différentes anomalies morphologiques retrouvées dans les syndromes myélodysplasiques	p.14
Figure 12 : Courbe de la survie des différentes leucémies aiguës myéloïdes	p.15
Figure 13 : Courbes de la progression des syndromes myélodysplasiques en leucémies aiguës myéloïdes ainsi que la survie sans progression	p.16
Figure 14 : Courbes des taux de survie dans les syndromes myélodysplasiques/syndromes myéloprolifératifs	p.18
Figure 15 : Fréquence des mutations somatiques dans les syndromes myélodysplasiques/syndromes myéloprolifératifs	p.19
Figure 16 : Représentation graphique en cytométrie de flux et en photos des trois populations monocytaires ainsi que la courbe ROC de diagnostic de la leucémie myélomonocytaire chronique	p.22
Figure 17 : Représentation graphique des 36 gènes retrouvés fréquemment mutés dans la leucémie myélomonocytaire chronique	p.23
Figure 18 : Modèle de la pathogénèse de la leucémie myélomonocytaire chronique	p.24
Figure 19 : Représentation graphique de l'épissage alternatif des gènes ainsi que les différentes formes d'épissage alternatif ou constitutif	p.27
Figure 20 : Résumé graphique du papier de Kim et al. 2015	p.28
Figure 21 : Représentation graphique de l'évolution d'une architecture clonale branchée et représentation de l'arbre de la vie de Darwin (1837)	p.32
Figure 22 : Accumulation de mutations somatiques au travers du temps avec des signatures « clock-like »	p.33
Figure 23 : Représentation de l'architecture clonale dans la leucémie myélomonocytaire chronique	p.35
Figure 24 : Représentation graphique montrant les différents potentiels de pluripotence	p.41
Figure 25 : Illustration des stratégies actuelles pour génération de cellules souches hématopoïétiques humaines	p.42
Figure 26 : Le rôle de la voie Wnt-beta-catenin et Activin-nodal dans l'hématopoïèse primitive et définitive.	p.43
Figure 27 : Représentation schématique du protocole « monocouche de cellules adhérentes »	p.46
Figure 28 : Photos à différents jours de la différenciation des cellules pluripotentes induites selon le protocole « monocouche de cellules adhérentes »	p.46
Figure 29 : L'utilisation potentielle des iPSCs dans la recherche sur le cancer	p.48
Figure 30 : Représentation schématique des protéines TET	p.106
Figure 31 : Distribution des mutations dans 8 gènes de l'épissage	p.110

Liste des abréviations

A

ABL1 : abelson 1
AKT: *AKT Serine/Threonine Kinase*
AR: anémie réfractaire
ARCH: *Age-Related Clonal Hematopoiesis*
AREB : anémie réfractaire avec excès de blastes
AREB-T : anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation
ARN-m: ARN messenger
ARN-pm: ARN pré-messenger
AR-SC : anémie réfractaire sidéroblastique acquise idiopathique
ASXL1: *Additional Sex Combs Like 1*
Azacytidine: 5-azacytidine

B

BCOR: *BCL6 Corepressor*
BCR: *breakpoint cluster region*
BFU-E : progéniteur primitif érythrocytaire
BMP : *Bone Morphogenetic Protein*

C

CALR : calréticuline
CBL : *Cbl Proto-Oncogene*
CCL2 : *C-C motif ligand 2*
CFU-C : progéniteur granulo-monocytaire
CFU-E : progéniteurs mature érythrocytaire
CFU-GM : progéniteur granulo-monocytaire
CFU-Mk : progéniteur mégacaryocytaire
CI : *interférence clonale*
CLP : Progéniteur commun lymphoïde
CMP : Progéniteur commun myéloïde
CSH : cellule souche hématopoïétique
CSPH : cellule souche pluripotente hématopoïétique

D

DCK : deoxycytidine kinase
Decitabine : 5-aza-2'-deoxycytidine
DNMT3A : *DNA Methyltransferase 3 Alpha*

E

Er : erythrocyte

ESE: *Exonic Splicing Enhancer*
ETV6: *ETS Variant 6*
EZH2: *Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*

F

FAB: *French-American-British*
FGFR1: *Fibroblast Growth Factor Receptor 1*
FGRS : *FOS, GFI1, RUNX1, SPI1*
FOSB : *FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog B*

G

GAP: *GTPase-activating protein*
GATA2 : *GATA-Binding Protein 2*
GDP: guanosine diphosphate
GEF: *guanine nucleotide exchange-factor*
GFI1 : *Growth Factor Independent 1 Transcriptional Repressor*
GMP: progéniteur granulo-monocytaire
GM-CSF: *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*
GTP: guanosine triphosphate
G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*

H

hnRNP: *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*
HUVEC :

I

IDH1 : *Isocitrate Dehydrogenase (NADP (+)) 1*
IDH2 : *Isocitrate Dehydrogenase (NADP (+)) 2*
IL-1 β : *Interleukin 1 beta*
IL-3 : *Interleukin-3*
IL-6 : *Interleukin 6*
IL-10 : *Interleukin 10*
iPSC : *induced Pluripotent Stem Cell*

J

JAK2 : *janus kinase 2*

K

KRAS : *KRAS Proto-Oncogene*

L

LAM : leucémie aiguë myéloïde
LCE : leucémie à éosinophiles
LCN : leucémie chronique à neutrophiles
LMC : leucémie myéloïde chronique
LMCa : leucémie myéloïde chronique atypique
LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique
LMMJ : leucémie myélomonocytaire juvénile
LOH: *Loss Of Heterozygosity*
LT-HSC : cellule souche de long terme

M

MDSC: *myeloid-derived suppressive cell*
MFP : myélofibrose primaire
Mk : megacaryocyte
MPL : *myeloproliferative leukemia protein*
MPP : progéniteur multipotent
My : myéloïde
MR : recombinaison mitotique

N

NRAS : *NRAS Proto-Oncogene*

O

OMS : organisation mondiale de la santé

P

PDGFA: *Platelet Derived Growth Factor Subunit A*
PDGFB: *Platelet Derived Growth Factor Subunit B*
PI3K : *Phosphoinositide-3-Kinase*
PV : maladie de Vasquez

Q

R

RAF: *Raf Proto-Oncogene*
RBC: Globule rouge
RUNX1: *Runt Related Transcription Factor 1*

S

SCF: *Stem cell factor*

SF3B1: *Splicing Factor 3b Subunit 1*

SMD : syndrome myélodysplasique

SMD/SMP-i : syndrome myélodysplasique/syndrome

ST-HSC : Cellule souche de court terme

SMP : syndrome myéloprolifératif

SMP-i : syndrome myéloprolifératif inclassable

SMD/SMP-SC-T : syndrome

myélodysplasique/syndrome myéloprolifératif avec

sidéroblastes en couronne et avec thrombocytose

snRNP: *small nuclear ribonucleoprotein*

SPI1 : *Hematopoietic Transcription Factor PU.1*

SRSF1 : *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1*

SRSF2 : *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2*

T

TCSH : transplantation de cellules souches
hématopoïétiques

TE: thrombocytémie essentielle

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor alpha*

U

UCK: uridine-cytidine kinase

U2AF35: *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor, 35 kD*

V

W

WES: *Whole-Exome Sequencing*

X

Y

Z

ZRSR2: *Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2*

Chapitre I : *introduction*

Préambule

La leucémie myélomonocytaire chronique est une hémopathie myéloïde rare attribuée à l'accumulation d'évènements génétiques et épigénétiques dans une cellule souche ou progénitrice hématopoïétique. Les altérations génétiques somatiques récurrentes qui caractérisent cette maladie ont été identifiées : elles associent diversement des altérations cytogénétiques non spécifiques chez 30% des patients et des mutations des gènes de la régulation épigénétique, de l'épissage des pré-ARN messagers, de la signalisation et de la transcription. La nature des gènes mutés influence le phénotype : les mutations de RUNX1 génèrent une thrombopénie, celles de la signalisation une maladie proliférative, celles de KIT une mastocytose associée. Ces altérations génétiques ne sauraient résumer à elles seules l'expression phénotypique de la maladie : les médicaments hypométhylants restaurent une hématopoïèse équilibrée en modifiant le contexte épigénétique des cellules malades sans les éliminer.

L'objectif de mon travail de thèse a été de modéliser la maladie en reprogrammant des cellules souches et progénitrices de patients atteints de cette maladie, avec l'espoir de capturer une partie de l'hétérogénéité génétique de la maladie. A partir des cellules CD34+ d'une patiente, nous avons établi 5 clones des cellules souches induites reprogrammées, correspondant à 2 profils génétiques distincts. Par une technique de correction de gènes, nous avons introduit dans certains clones la mutation SRSF2^{P95H}, observée dans les cellules de 50% des patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique mais absente chez la patiente étudiée. Nous montrons que le comportement hétérogène des clones de cellules reprogrammées en culture dépasse la simple hétérogénéité génétique de la maladie.

La présentation de ces résultats sera précédée d'une revue de la littérature en 3 parties dédiées respectivement à la compréhension actuelle de l'organisation de l'hématopoïèse, à la maladie étudiée et au modèle choisi pour réaliser ce travail.



I. Le système hématopoïétique

Le modèle de l'hématopoïèse le plus connu des hématologues et des immunologues est le modèle « hiérarchique » ou « traditionnel » proposé initialement par Irving Weissman (Akashi et al. 2000). Ce modèle est très controversé : la nature des progéniteurs et les relations entre lignages font l'objet de nombreux débats. De nouveaux modèles émergent comme la « hiérarchie à deux niveaux », le modèle « CLOUD-HSPC » ainsi que le modèle de « perte égale de potentiel ».

I. 1. Le modèle hiérarchique traditionnel

Après la description, en 1997, d'un progéniteur commun lymphoïde (CLP) pouvant donner naissance à des lymphocytes T et des lymphocytes B mais ne pouvant pas se différencier en cellules myéloïdes (Kondo et al. 1997), l'équipe de Weissman découvre en 2000 un progéniteur commun myéloïde (CMP) pouvant donner naissance aux différentes cellules myéloïdes mais ne pouvant pas se différencier en cellules lymphoïdes. A cette occasion, l'équipe propose un modèle hiérarchique (figure 1a) s'inspirant des premiers travaux de Till and McCulloch (figure 1b, Till & McCulloch 1980). Ce modèle deviendra rapidement le modèle de référence.

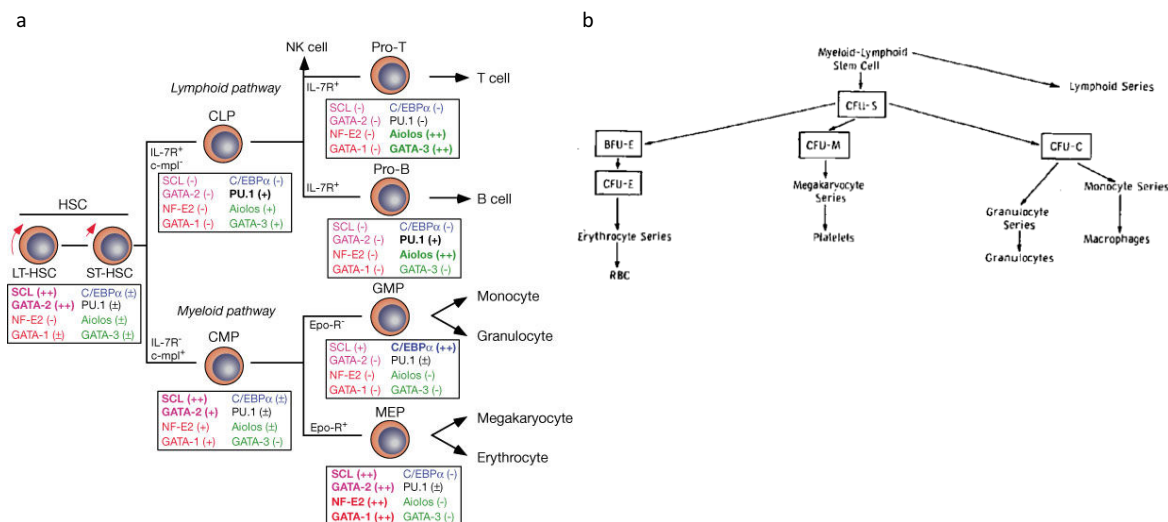


Figure 1 : Système hématopoïétique de Weissman (2000) et de Till et McCulloch.

a) Le système hématopoïétique de Weissman. Les cellules souches hématopoïétiques à long terme (LT-HSC) donnent naissance aux cellules souches à court terme (ST-HSC). Ces ST-HSC donnent naissance à au moins un progéniteur commun lymphoïde (CLP), qui peut former toutes les cellules de la lignée lymphoïde, et un progéniteur commun myéloïde (CMP), qui peut se différencier en progéniteurs granulo-monocytaires (GMPs) ou en progéniteurs méga-érythrocytaires (MEPs), qui eux, peuvent former la lignée granulo-monocytaire ou la lignée méga-érythrocytaire, respectivement. (Akashi et al. 2000) (numéro de licence : 4198901116502), b) Modèle de Till & McCulloch. La classe cellulaire indiquée à l'intérieur des rectangles peut être détectée à l'aide des cultures en milieu semi-liquide (expérience de méthylcellulose). CFU-S : cellules souches myéloïdes pluripotentes. BFU-E : progéniteurs primitifs érythrocytaires. CFU-E : progéniteurs matures érythrocytaires. CFU-M : progéniteurs mégacaryocytaires. CFU-C (aussi nommée CFU-GM) : progéniteurs granulo-monocytaires. RBC : globules rouges (Till and McCulloch 1980) (numéro de licence : 4198910368006).



Dans cette proposition, les cellules à forte capacité d'auto-renouveaulement et ayant une durée de vie prolongée comme les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) à long et court terme sont rares et résident à l'apex de la pyramide. Ces cellules se différencient en cellules souches intermédiaires dont la durée de vie est plus courte et les capacités d'auto-renouveaulement limitées, tels que les progéniteurs multipotents (MPP), les CMP et les CLP. Les progéniteurs oligopotents ou unipotents, qui sont en bas de la pyramide, ont une durée de vie très courte et peuvent générer plus de 10 cellules hématopoïétiques fonctionnelles.

Dès le début du XX^{ème} siècle, des modèles de système hématopoïétique avaient été proposés. Par exemple, Pappenheim et Neumann en 1905 (figure 2) suggèrent que l'ensemble des cellules hématopoïétiques proviennent d'une cellule souche multipotente nichée dans la moelle osseuse (Maehle 2011).

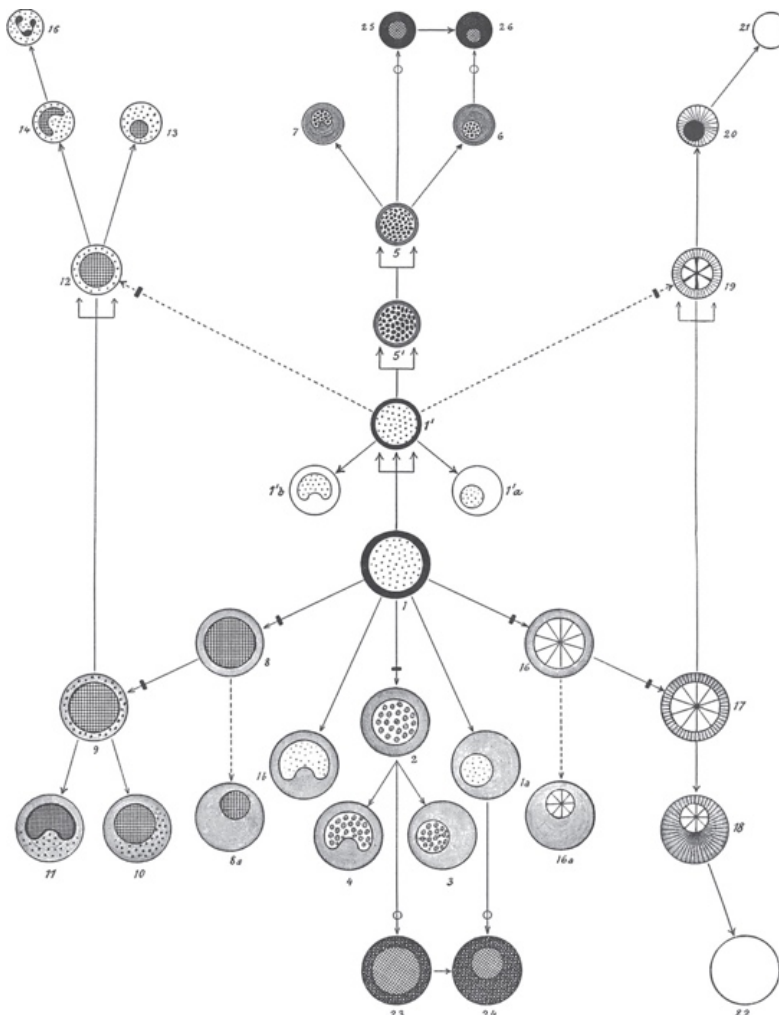


Figure 2 : Système hématopoïétique de Pappenheim (1905).

La cellule multipotente (no. 1) au milieu du schéma est mise en évidence par l'épaisseur du trait du cercle. Elle est à l'origine de la « branche myéloléucoplastique » (à gauche), de la « branche érythroplastique » (à droite), de la « branche lymphoplastique » (au milieu, au-dessus) et de la « branche splénoplastique » (au milieu, en bas). (Maehle 2011) (licence CC-BY 4.0)

I. 2. Le modèle de hiérarchie à deux niveaux

Les arguments qui vont à l'encontre du modèle hiérarchique traditionnel sont que 1) certains progéniteurs mégacaryocytes-érythrocytes (Mk-Er) peuvent être générés par les CSHs sans passer par les stades intermédiaires MPPs et CMPs (Yamamoto et al. 2013) ; 2) certains progéniteurs, dits myéloïde/lymphoïde (MLP), ont un potentiel de différenciation à la fois lymphoïde et myélomonocytaire (Doulatov et al. 2010; Laurenti et al. 2013) ; 3) plus de la moitié des progéniteurs multipotents engagés vers la lignée lymphoïde (LMPP) génèrent des cellules dendritiques que l'on pensait provenir uniquement des progéniteurs CMP (Naik et al. 2013). Ces observations conduisent l'équipe de John Dick à proposer en 2016 un modèle de « Hiérarchie à deux niveaux » [Figure 3, (Notta et al. 2016)].

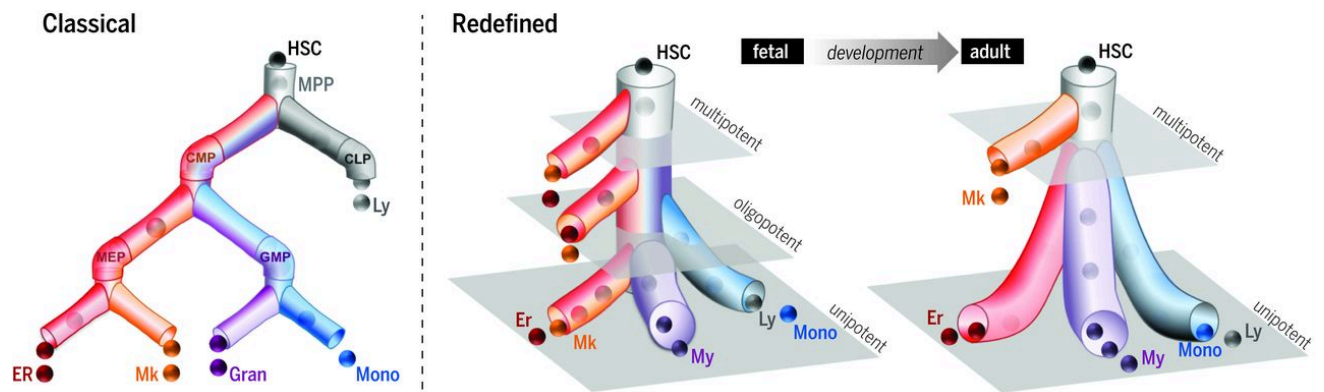


Figure 3 : Système hématopoïétique de Dick (2016).

Le modèle classique envisage que les progéniteurs oligopotents comme les progéniteurs communs myéloïdes (CMPs) sont une étape intermédiaire essentielle de la différenciation des cellules myéloïdes/érythrocytaires/mégacaryocytaires (My/Er/Mk). Le « modèle redéfini » propose un changement d'architecture au cours du développement : chez le fœtus, beaucoup de cellules souches et progénitrices sont multipotentes ; chez l'adulte, le compartiment des cellules souches est multipotent mais les progéniteurs sont unipotents. Les plans gris représentent les « tiers théoriques » de différenciation (Notta et al. 2016) (numéro de licence : 4198910495570)

L'évolution de l'organisation du système hématopoïétique au cours du développement est nouvelle. Dans le foie fœtal, les progéniteurs oligopotents Myéloïdes/Erythrocytaire/Mégacaryocytaire (My/Er/Mk) et Er-Mk sont prééminents. Dans la moelle osseuse adulte, les progéniteurs unipotents My et Er dominant et les progéniteurs Mk sont très fortement liés aux destins des MPPs. Ces données ne concordent pas avec la notion selon laquelle les lignées My, Mk et Er proviennent d'un progéniteurs commun « CMP » (Notta et al. 2016).

I. 3 Le modèle CLOUD-HSPC

Le modèle *continuum of low-primed undifferentiated haematopoietic stem and progenitor cells* (CLOUD-HSPCs) s'appuie sur une analyse à l'échelle unicellulaire de la moelle osseuse montrant que les CSHs expriment les caractéristiques de plusieurs lignées et peuvent générer directement les cellule d'une lignée sans passer par l'étape « progéniteur stable et bien identifié » [fig 4a, (Velten et al. 2017)].

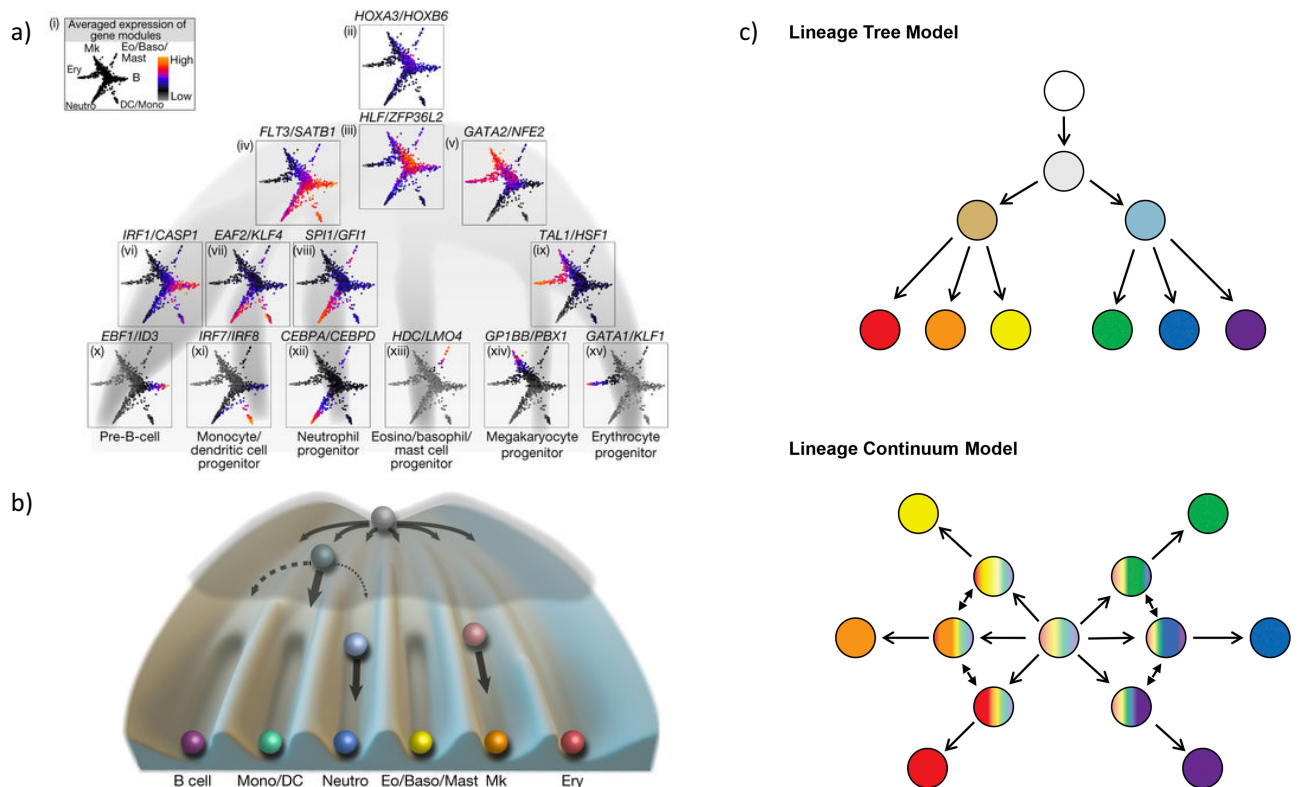


Figure 4 : Système hématopoïétique de Steinmetz (2017).

a) L'activité des modules de gènes associés à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSHs). Les gènes ont été classés et regroupés selon le degré et la direction du priming. L'expression des gènes moyennés selon l'individu 1 a été mise en évidence dans le continuum de différenciation des CSHs. b) Résumé graphique du modèle d'hématopoïèse en continu dans la moelle osseuse. Du fait de l'interaction de certains réseaux de régulation de gènes, certains états ou transitions cellulaires sont plus probables que d'autres, représentés par une légère élévation des barrières à l'intérieur du « paysage de Waddington ». Au moment où une cellule entre dans une lignée, de petites barrières apparaissent qui séparent progressivement la cellule des autres lignées, créant un biais dans les CSHs. Au stade des progéniteurs ces barrières sont déjà beaucoup plus prononcées (Velten et al. 2017) (numéro de licence : 4198910719933). c) Le modèle classique : la CSH est situé en haut du schéma en blanc. Le modèle du continuum : toutes les cellules sont très différentes du point de vue transcriptionnelle et subissent un engagement direct pour générer des cellules distinctes, ce qui s'oppose au modèle classique où la CSH passera au travers d'une série de progéniteurs stables et distincts (Hirschi, Nicoli, and Walsh 2017) (numéro de licence : 4198910835157)

Dans ce modèle, les CSHs sont au sommet d'une vallée plate. Des barrières séparent les différentes lignées hématopoïétiques qui émergent et s'amplifient graduellement, ce qu'illustre les variations progressives dans l'expression de certains gènes qui déterminent le destin de ces cellules. Lorsque ces barrières deviennent infranchissables, l'engagement vers une lignée est

irréversible (figure 4b). A la suite de ce travail, une représentation plus schématique des résultats de ces travaux est proposée pour faciliter la compréhension du nouveau modèle [figure 4c, (Hirschi, Nicoli, and Walsh 2017)].

I. 4 Le modèle de perte égale de potentiel

L'utilisation du « barcoding » suggère que les LMPP produisent essentiellement des cellules dendritiques sans générer de cellules lymphoïdes ou myéloïdes (Naik et al. 2013), ce qui ne concorde pas avec le modèle classique. Dans la continuité des travaux décrits ci-dessus, Perié et al., utilisant là encore la technologie du « barcoding », proposent un modèle différent (figure 5, (Perié et al. 2014)) dans lequel existe une lignée dendritique, extérieure aux lignées myéloïde et lymphoïde (Naik et al. 2013).

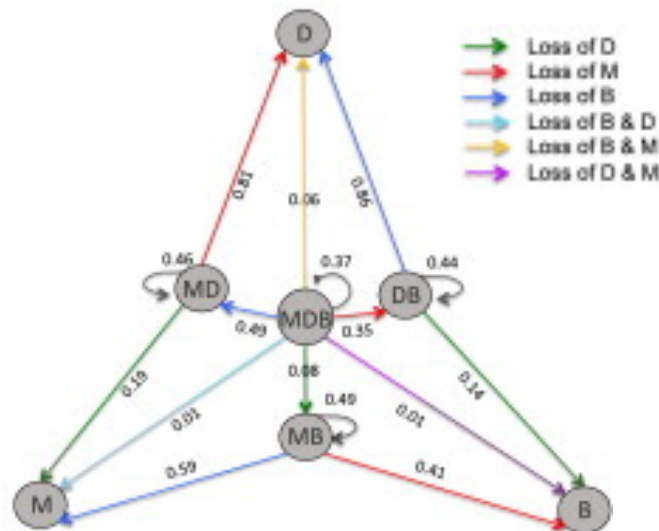


Figure 5 : Système hématopoïétique de Duffy (2014).

Le modèle de perte égale de potentiel [The equal loss of potential (ELP)] possède tous les liens du modèle classique, mais ses probabilités de transitions sont contraintes : la probabilité de perdre le potentiel de produire un certain type de cellules (M, rouge ; B, bleu ; D, vert) reste proportionnellement égale à chaque étape de la différenciation, ce qui se traduit par l'utilisation de la même couleur pour l'illustration. La probabilité de perdre 2 potentiels à la fois est le produit de la probabilité de perdre chaque potentiel indépendamment. La meilleure valeur des probabilités a été calculée à l'aide de 7 paramètres du modèle de perte égale de potentiel (Perié et al. 2014) (numéro de licence 4198910957515).

II. La leucémie myélomonocytaire chronique

II. 1. Les hémopathies myéloïdes

Les hémopathies myéloïdes sont un continuum de pathologies qui prennent leur origine dans les CSHs, ou plus rarement dans les progéniteurs myéloïdes (Cozzio et al. 2003; Huntly et al. 2004). Ces maladies sont catégorisées en 4 groupes en fonction de données génétiques, morphologiques, immunophénotypiques et cliniques: 1) les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des pathologies partageant des mutations ou des modifications chromosomiques qui activent de manière constitutive des voies de signalisation, entraînant la prolifération d'une ou plusieurs lignées myéloïdes par hypersensibilité à une cytokine, 2) les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des pathologies entraînant une prolifération excessive des progéniteurs myéloïdes, une dysmyélopïèse mais aussi, au moins initialement, une apoptose excessive conduisant à des cytopénies, 3) les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont caractérisées par un arrêt de la différenciation et une accumulation de cellules myéloïdes non différenciées (appelées myéloblastes), 4) les syndromes myéloprolifératifs/myélodysplasiques (SMP/SMD) sont caractérisés par la présence de signes de dysplasie et la prolifération inadaptée d'au moins une des lignées myéloïdes [figure 6, (Deininger, Tyner, and Solary 2017)].

Un tiers des nouvelles hémopathies malignes sont des hémopathies myéloïdes. Le plus souvent, ces hémopathies myéloïdes sont associées au vieillissement mais il existe des différences entre et au sein des 4 groupes définis par l'OMS (figure 7a). Les hémopathies myéloïdes sont beaucoup plus fréquentes chez l'homme que chez la femme (figure 7b). La survie est très hétérogène : les patients ayant une LAM ont le moins bon pronostic avec une courbe plongeante dès les premiers mois ; les patients ayant un SMP ont la meilleure courbe de survie, frôlant les 95% à 3 ans. Les patients ayant un SMD ou un SMD/SMP se situent entre les deux avec une médiane de survie de 1 an et 9 mois (figure 7c).

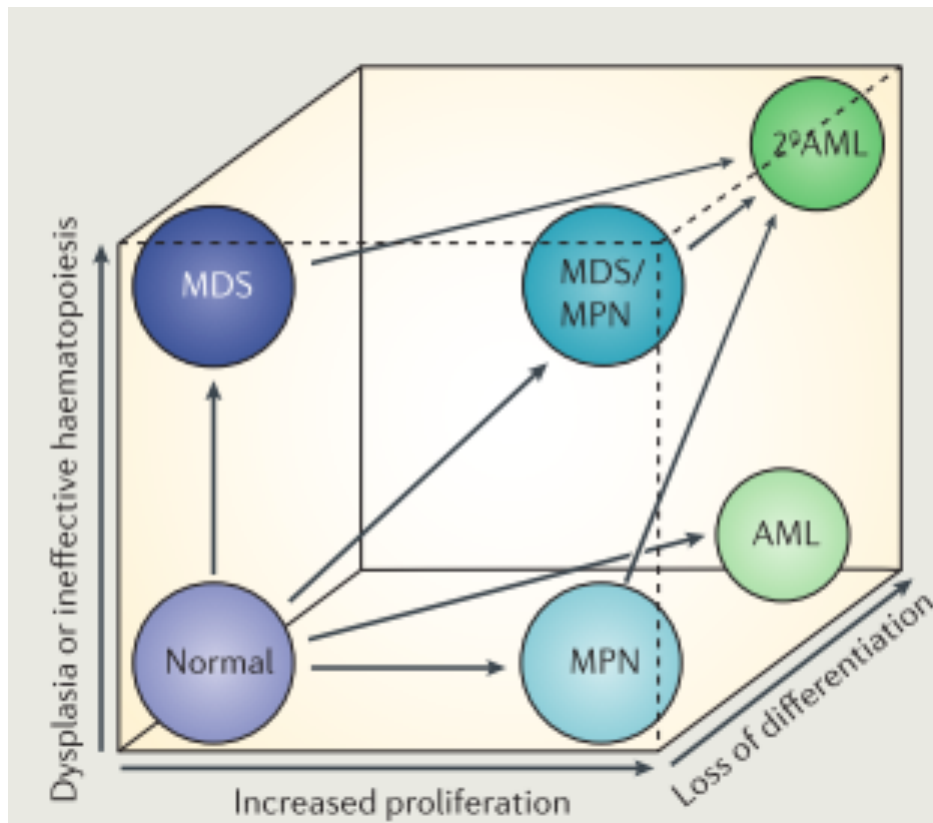


Figure 6 : Représentation en 3D des différentes hémopathies myéloïdes.

Lors de la myélopoïèse normale, l'abondance relative des lignées myéloïdes (érythropoïèse, granulopoïèse, monocytopoïèse et la megacaryopoïèse) dans la moelle osseuse et le nombre de cellules dans le sang (exprimé en nombre de cellules par litre de sang) sont maintenus dans des limites étroites (Mercier and Scadden 2015). La différenciation hématopoïétique progresse par étapes morphologiquement définies et seules les cellules matures sont libérées de la moelle osseuse dans le sang. Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont caractérisés par la prolifération excessive d'une ou plusieurs lignées myéloïdes et par une hématopoïèse extramédullaire, typiquement dans la rate et/ou le foie. La morphologie des cellules hématopoïétiques est normale et la différenciation est maintenue. Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont caractérisés par une diminution du nombre d'érythrocytes, de granulocytes et/ou de plaquettes dans le sang, alors que la moelle osseuse est très fréquemment hypercellulaire, avec une hématopoïèse inefficace. La caractéristique classique des SMD est la dysplasie, une déformation d'une morphologie cellulaire normale à un certain stade de la différenciation. Bien que les critères diagnostiques de la dysplasie aient été clairement identifiés, il existe de considérables variations inter-observateurs et le diagnostic peut être compliqué si la dysplasie est modérée (Senent et al. 2013). Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont caractérisées par un arrêt de différenciation et une accumulation de cellules myéloïdes non différenciées (myéloblastes). Les LAM sans antécédents d'hémopathies et sans exposition à une chimiothérapie ou à une radiothérapie sont dites « de novo », alors que le terme « LAM secondaire » indique une LAM qui s'est développée à partir d'un SMD ou d'un SMP préexistant ou après une exposition toxique. Les SMD/SMP présentent une combinaison de caractéristiques des SMD et des SMP avec une dysplasie et un excès de production de cellules hématopoïétiques d'au moins une lignée myéloïde. La progression d'un SMD ou d'un SMP vers un SMD/SMP est relativement rare mais les patients avec un SMD/SMP présentent généralement les caractéristiques clés des deux syndromes précédents. Les flèches montrent les évolutions observées chez les patients (Deininger, Tyner, and Solary 2017) (numéro de licence : 4198911135746)

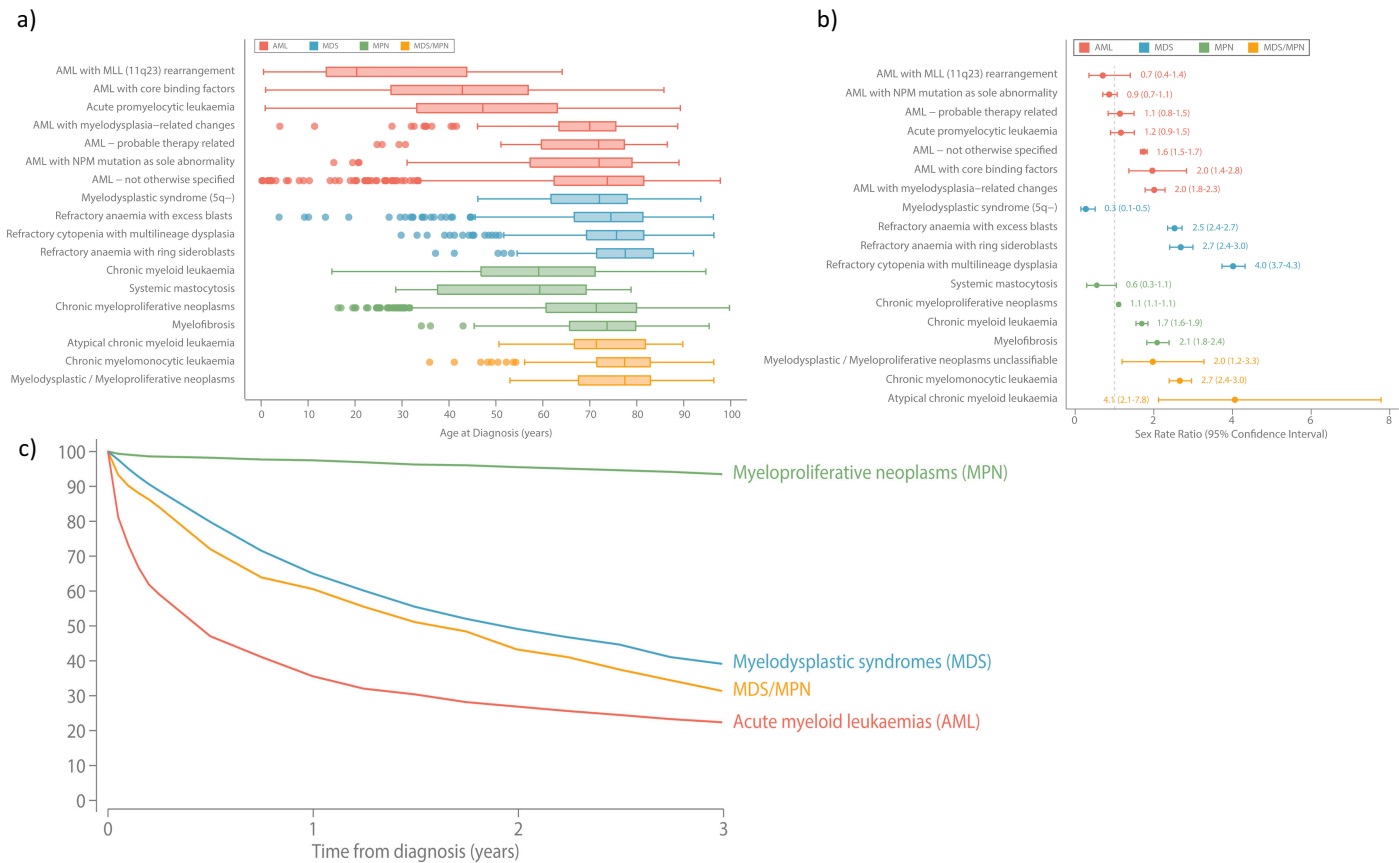


Figure 7 : Représentation graphique de l'âge de diagnostic, ratio sexuelle ainsi que de la mortalité selon les différentes hémopathies myéloïdes

a) Age au diagnostic; leucémie aiguë myéloïde (AML), syndromes myélodysplasiques (MDS), syndromes myéloprolifératifs (MPN) ; and MDS/MPN (Réseau de recherche des hémopathies malignes 2004-2013), b) Age standardisé (European 2013), sexe ratio par groupe de diagnostic ; AML ; MDS ; MPN ; MDS/MPN : (Réseau de recherche des hémopathies malignes 2004-2013), c) 3 ans de suivi avec estimation de la survie des groupes principaux de diagnostic (Roman et al. 2016) (licence CC-BY)

II. 1. 1. Les syndromes myéloprolifératifs (ou néoplasmes myéloprolifératifs)

La classification de l'Organisation Mondiale de la santé (OMS) reconnaît 7 sous-types de SMP. (1) La Leucémie chronique myéloïde (LMC) qui est une des rares pathologies définies par la présence d'un évènement oncogénique unique, en l'occurrence une fusion de la région *BCR* et l'oncogène *ABL1*. Dans les SMP dites « *BCR-ABL1*-négative » (2) la maladie de Vasquez (PV), (3) la thrombocytémie essentielle (TE) et (4) la myélofibrose primaire (MFP) sont collectivement souvent nommés les SMP classiques. (5) La leucémie chronique à neutrophiles (LCN), (6) la leucémie chronique à éosinophiles ainsi que les (7) SMP inclassables (SMP-i) sont beaucoup moins fréquentes et sont collectivement nommés « SMP atypiques ou non classiques ».

Etant donné le chevauchement des caractéristiques cliniques et morphologiques des SMP, l'utilisation de marqueurs génétiques spécifiques de certains sous-types de SMP est utile au



diagnostic comme à la prise de décisions thérapeutiques (Arber et al. 2016). La détection de la fusion *BCR-ABL1* (ou du chromosome Philadelphie au caryotype) est utilisée depuis longtemps pour faire le diagnostic de LMC. La mise à jour de la classification des SMP par l'OMS en 2016 introduit prudemment un nombre croissant de marqueurs génétiques dans la définition des SMP (Arber et al. 2016). De manière générale, ces maladies sont classées selon la lignée myéloïde prédominante dans le sang périphérique : la PV est caractérisée par un excès d'érythrocytes et la TE par un excès de plaquettes. Les patients atteints de MFP présentent une fibrose de la moelle osseuse, des mégacaryocytes anormaux, des numérations sanguines variables, une hématopoïèse extramédullaire et une hépatosplénomégalie. Les SMP sont peu fréquents avant 50 ans et leur incidence augmente exponentiellement après 60 ans (McNally et al. 1997). Mis à part les MFP ayant un taux de 42% à 5 ans, toutes les autres pathologies ont un taux de survie entre 85 et 95% à 5 ans (figure 8).

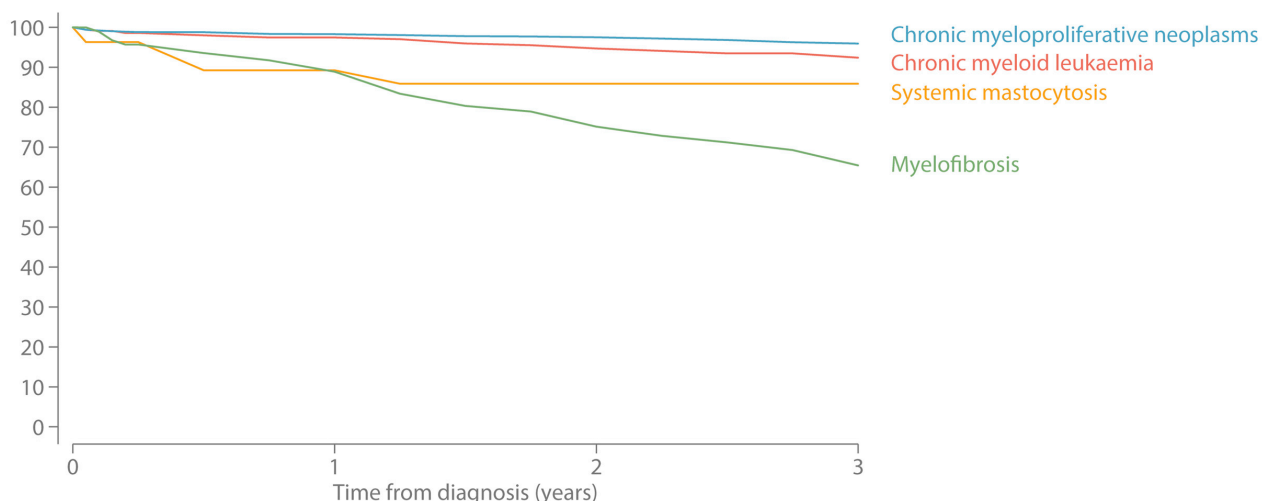


Figure 8 : Courbe de la survie des différents syndromes myéloprolifératifs.

3 ans de suivi avec estimation de la survie au sein des syndromes myéloprolifératifs (Roman et al. 2016) (licence CC-BY).

Les SMP « *BCR-ABL1*-négatifs » sont des maladies clonales liées à l'acquisition, dans la cellule souche hématopoïétique, d'au moins une mutation somatique (dite *driver*) affectant principalement les gènes *JAK2*, *MPL* ou *CALR*. Chez l'adulte, l'acquisition sporadique d'une de ces mutations dans une CSH ne conduit pas forcément à une situation pathologique (Hinds et al. 2016), suggérant l'intervention d'autres paramètres. L'expansion clonale est liée au sexe et à l'âge du patient (Spivak et al. 2014; Stein et al. 2010). Une prédisposition génétique est probable, même si elle n'a été identifiée que dans 7% des cas dans lesquels, par exemple, un polymorphisme tel que l'haplotype '46/1' aussi nommé 'GGCC' augmente d'un facteur 3 le risque d'acquérir une mutation activatrice de *JAK2* (Jones et al. 2008). Les SMP ont une faible fréquence de mutations, de l'ordre

de 0,2 par mégabase. Le nombre de mutations est fonction de l'âge du patient mais pas de la progression de la maladie ou de mutations *driver* particulières (Nangalia et al. 2013).

La dérégulation directe ou indirecte de l'activité de JAK2 par l'acquisition d'une mutation somatique est l'anomalie la plus fréquemment retrouvée dans les SMP classiques non *BCR-ABL1*. Les principales mutations sont celles qui affectent JAK2, CALR et MPL (figure 9). La mutation la plus fréquente est JAK2^{V617F}, présente dans plus de 95% des PV et 50-60% des PMF et des TE. JAK2 est une tyrosine kinase qui intervient dans la transduction du signal des récepteurs de cytokines de classe I comme le récepteur à l'érythropoïétine, le récepteur à la thrombopoïétine (codé par le gène *MPL*) et le récepteur au *Granulocyte Colony Stimulating Factor* [G-CSF, (Cross 2011; Vainchenker & Constantinescu 2013)]. La calréticuline est une protéine chaperonne qui contribue à maintenir les protéines dans une conformation correcte mais joue aussi un rôle dans le trafic de glycoprotéines et le contrôle homéostatique du niveau de calcium. De manière intéressante, les mutations de *CALR* activent le récepteur de la thrombopoïétine en liant à son domaine extracellulaire des résidus N-glycosylés, ce qui active JAK2 (Chachoua et al. 2016; Elf et al. 2017; Marty et al. 2016).

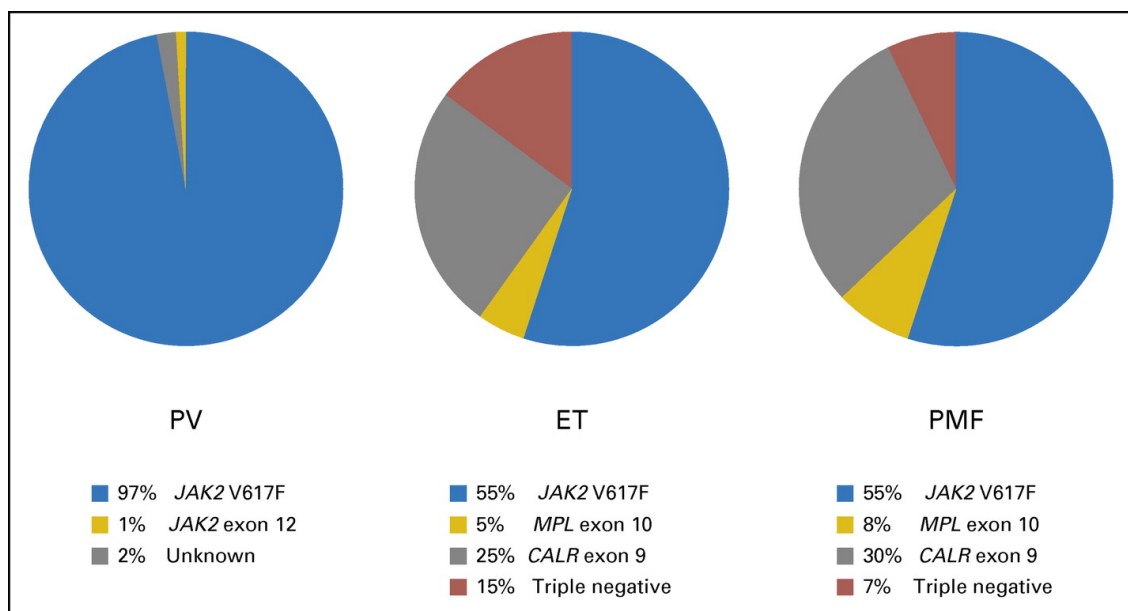


Figure 9 : Représentation graphique des différents gènes retrouvés mutés dans les syndromes myéloprolifératifs. Principales mutations récurrentes dans les SMP classiques BCR-ABL1 négatifs. ET : thrombocytémie essentielle, PMF : myélofibrose primaire, PV : la maladie de Vaquez. (Zoi and Cross 2017) (numéro de licence : 4198920046295).

II. 1. 2. Les syndromes myélodysplasiques

C'est en 1982 que le groupe coopératif FAB (French-American-British) définit les SMD et propose une classification en 5 catégories: l'anémie réfractaire (AR), l'anémie réfractaire sidéroblastique acquise idiopathique (AR-SC), l'anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB), l'anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation (AREB-T) et la leucémie myélomonocytaire chronique [LMMC, (Bennett et al. 1982)]. La caractéristique principale qui distingue ces entités est le pourcentage de blastes dans la moelle osseuse : moins de 5% dans les AR et ARSAI, entre 5 à 20% dans les AREB, entre 21 et 30% dans les AREB-T et entre 0 et 20 % dans les LMMC. Les ARSAI ont au moins 15% de sidéroblastes en couronne parmi les précurseurs érythrocytaires et les LMMC sont caractérisées par une monocytose chronique. En 2001, l'OMS modifie cette classification en diminuant le niveau de blastes requis pour identifier une LAM (il passe de 30 à 20%), ce qui supprime de facto l'entité AREB-T, en reconnaissant qu'il est possible d'avoir une dysplasie de plusieurs lignées myéloïdes, en isolant la del(5q) comme une entité indépendante avec un faible pourcentage de myéloblastes, et en plaçant la LMMC dans une nouvelle catégorie à la frontière entre SMP et SMD (Vardiman, Harris, and Brunning 2002).

La classification de l'OMS reconnaît maintenant 6 entités. (1) Les SMD avec une seule lignée dysplasique, (2) les SMD avec sidéroblastes en couronnes, (3) les SMD avec plusieurs lignées dysplasiques, (4) les SMD avec un excès de blastes, (5) les SMD avec une del(5q) isolée et (6) les SMD non classifiables. Les SMD sont caractérisés par une hématopoïèse inefficace, des manifestations cytologiques de dysplasie dans les cellules hématopoïétiques et une ou des cytopénie(s) périphérique(s).

Tout comme les SMP, les SMD sont inhabituels avant l'âge de 50 ans en dehors des situations de prédispositions génétiques, de mieux en mieux identifiées (figure 7a). Par exemple, une maladie plaquettaire familiale associée à une mutation germinale de RUNX1 situé sur le chromosome 21q22 prédispose à la survenue de translocations chromosomiques et de mutations somatiques conduisant à l'émergence d'une LAM ou d'un SMD (Mikhail et al. 2006).

Les SMD sont parmi les cancers hématologiques les plus représentés chez les patients de plus de 70 ans (Rollison et al. 2008). L'incidence est 1,8 fois plus importante chez les hommes que chez les femmes [figure 7b, (Rollison et al. 2008)]. La survie à 3 ans est très hétérogène : les SMD avec un excès de blastes ont un très mauvais pronostic dû à la forte progression de la maladie en LAM (figure 10).

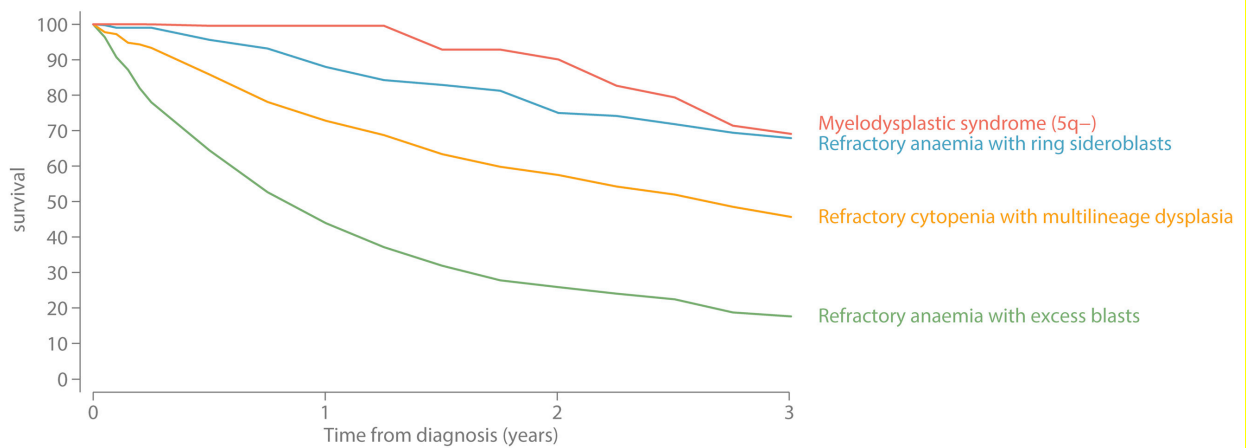


Figure 10 : Courbe de la survie des différents syndromes myélodysplasiques.

3 ans de suivi avec estimation de la survie au sein des syndromes myélodysplasiques (Roman et al. 2016) (licence CC-BY).

Les patients ayant un SMD présentent, de manière générale, une anémie et d'autres cytopénies. Une lignée érythrocytaire dysmorphique, des polynucléaires neutrophiles au noyau hyposegmenté (anomalie pseudo-Pelger-Huët) et peu de granules. La dysplasie dans la moelle osseuse doit au moins toucher 10% des cellules d'une lignée myéloïde spécifique. Des sidéroblastes en couronnes reflètent une accumulation anormale de fer dans les mitochondries, qui est parfois accompagné de signes de dysérythropoïèse (figure 11).

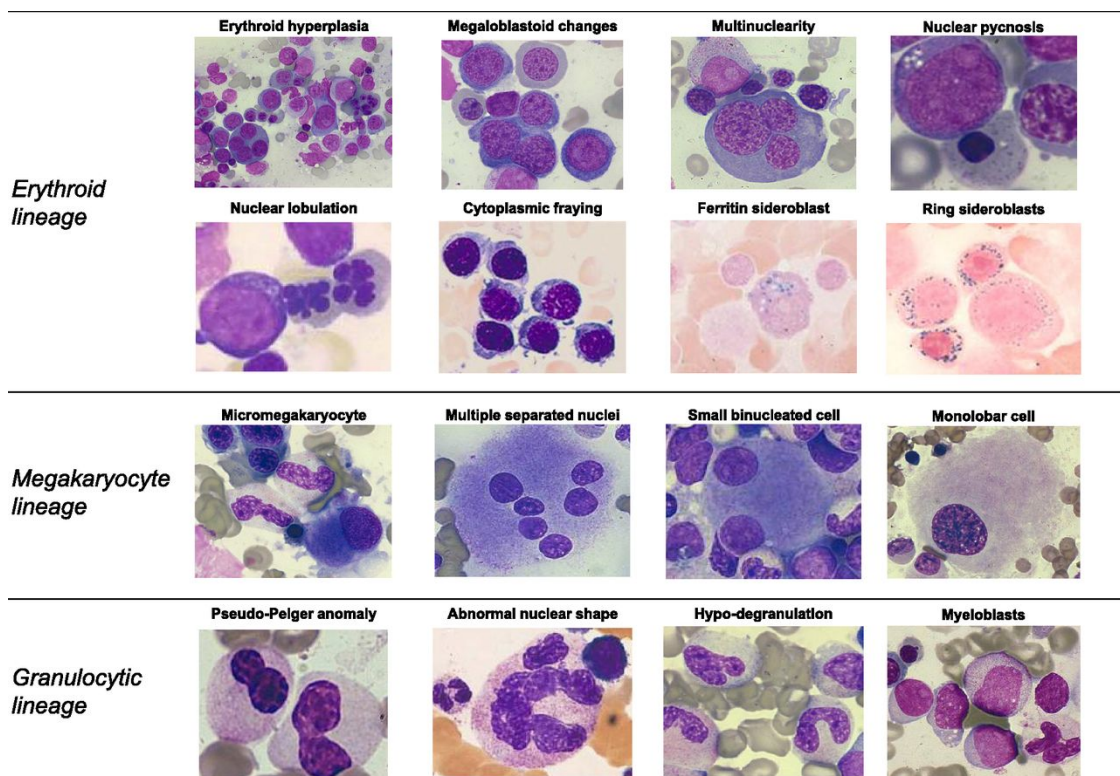


Figure 11 : Photos des différentes anomalies morphologiques retrouvées dans les syndromes myélodysplasiques.

Exemples représentatifs des anomalies morphologiques dans les syndromes myélodysplasiques. Coloration May Grünwald Giemsa dans toutes les images avec la seule exception des sidéroblastes en couronne (coloration de Perls). Grossissement de 2003 à 10003 (Cazzola, Porta, and Malcovati 2013) (numéro de licence : 501315828).



Environ 50% des patients atteints d'un SMD ont une anomalie cytogénétique dont la plus fréquente est la del(5q), suivie de la trisomie 8, de la monosomie Y, de la délétion du bras long du chromosome 20 [del(20q)] et de la monosomie 7 (Schanz et al. 2012). Ces anomalies cytogénétiques ne sont pas spécifique et sont fréquemment trouvées dans d'autres hémopathies myéloïdes (Wassie et al. 2015). Grâce aux avancées des techniques de séquençage, des mutations somatiques récurrentes sont retrouvées chez les patients atteints d'un SMD (Elli Papaemmanuil et al. 2013). Les gènes mutés de manière récurrente sont impliqués notamment dans la régulation épigénétique (TET2, ASXL1, EZH2, DMT3A, IDH1, IDH2), l'épissage des pré-ARN messagers (SF3B1, SRSF2, U2AF35, ZRSR2), la réparation de l'ADN (TP53), la régulation de la transcription (RUNX1, BCOR, ETV6), et la transduction de signal (CBL, NRAS, KRAS, JAK2).

II. 1. 3. Les leucémies aiguës myéloïdes

Les LAM sont caractérisées par une infiltration de la moelle osseuse, du sang et d'autres tissus par des myéloblastes, qui sont des progéniteurs hématopoïétique anormaux, très peu différenciés et très prolifératifs. Les catégories majeures de la classification OMS sont les LAM de novo, les LAM secondaires à une hémopathie myéloïde chronique, les LAM secondaires à un traitement et les LAM non spécifiées.

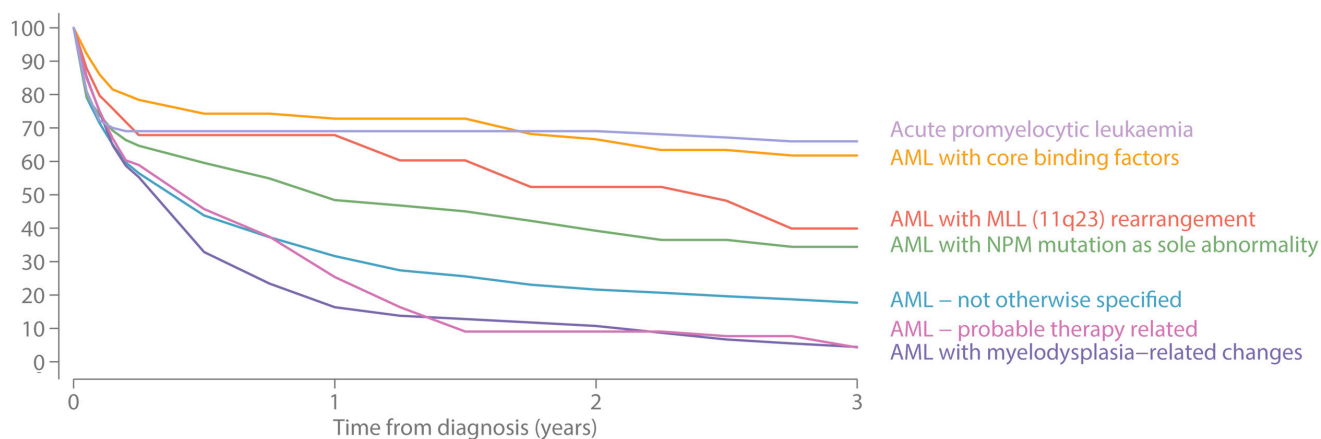


Figure 12 : Courbe de la survie des différentes leucémies aiguës myéloïdes.

3 ans de suivi avec estimation de la survie au sein des leucémies aiguës myéloïdes (Roman et al. 2016) (licence CC-BY).

Une LAM apparaissant au cours de l'évolution d'un SMP ou d'un SMD est de mauvais pronostic (J. A. Kennedy et al. 2013). L'incidence chez patients atteints de TE est estimée à 1,5%, chez les patients ayant une PV à 7% (Berk et al. 1981), et chez les patients ayant une MFP à 11% (Cervantes et al. 1991). Les blastes de LAM secondaire à un SMP proviennent la plupart du temps d'un sous-clone et non du clone initial (Gerber et al. 2011). Au sein des LAM, il y a une très forte

hétérogénéité de la survie à 3 ans, allant du plus faible dans les LAM secondaires (quelques % de survie à 3 ans) au plus élevé dans la LAM promyélocytaire ou LAM3 (survie supérieure à 90% à 3 ans, figure 12).

L'incidence des LAM est particulièrement élevée chez certains SMD, considérés comme des états pré-leucémiques. C'est le cas, par exemple, des AREB et des SMD avec anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic (par exemple monosomie 7, délétion du bras long du chromosome 7, trisomie 8 et délétion du bras court 17), le risque de transformation chez ces patients étant de plus de 50% (figure 13 a & b, Bernasconi et al. 2007).

Une étude récente de l'expression de gènes dans les cellules mononuclées de patient ayant un SMD a montré que 23 % des patients avaient un profil de LAM, 50% un profil SMD et 24% un profil « non-leucémique ». Ces données confortent le concept selon lequel il existe des étapes pré-leucémiques (K. I. Mills et al. 2009). Le profil d'expression typique des LAM est retrouvé chez plus de 68% des patients ayant une AREB avec une survie plus faible que celle des patients ayant un profil « non-leucémique » qui ne développent pas, ou très rarement, une LAM (K. I. Mills et al. 2009).

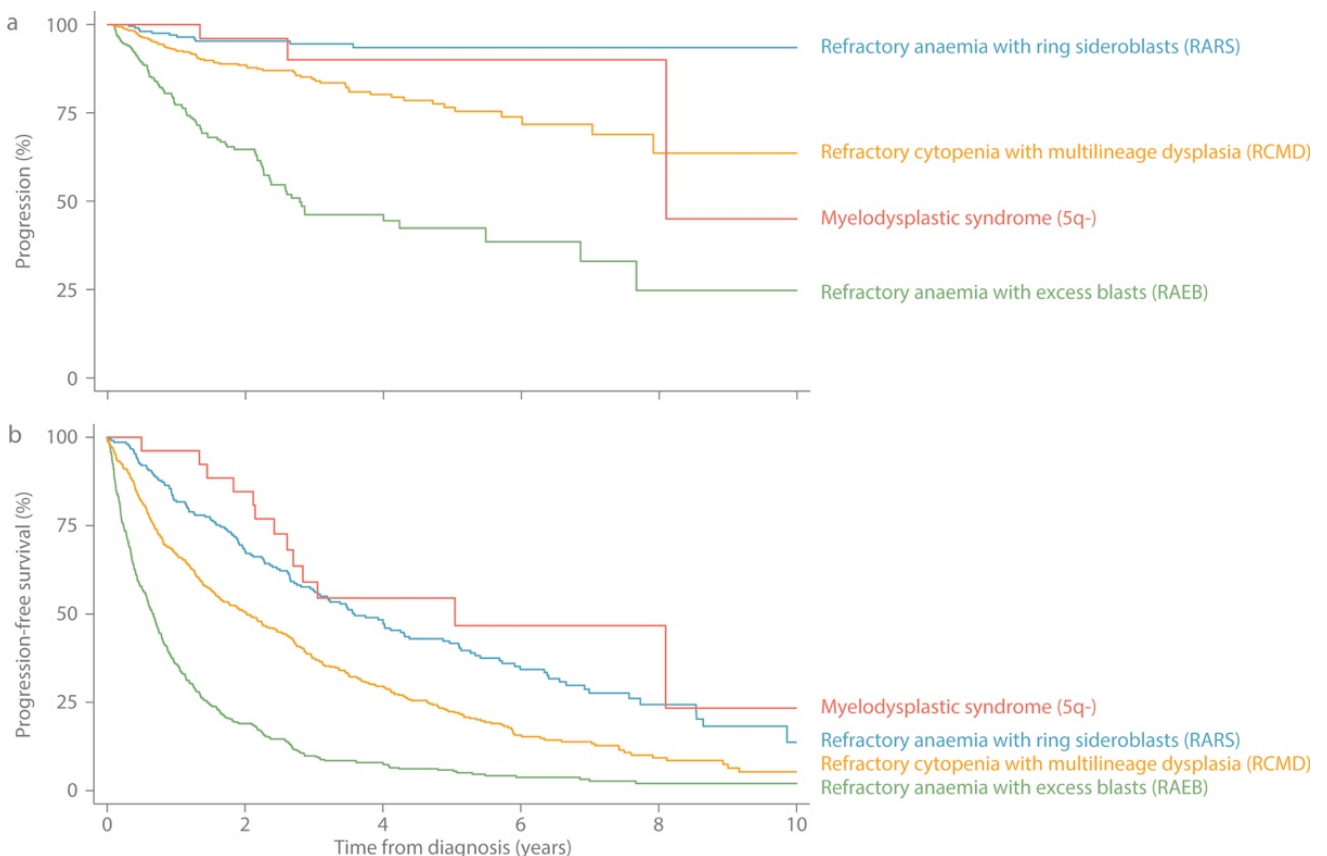


Figure 13 : Courbes de la progression des syndromes myélodysplasiques en leucémies aiguës myéloïdes ainsi que la survie sans progression.

Syndromes myélodysplasiques a) sans progression en leucémie aiguë myéloïde, b) survie sans progression : Réseau de recherche des hémopathies malignes, diagnostics de septembre 2004 à août 2013 suivi jusqu'en février 2015 (Roman et al. 2016) (licence CC-BY).



La plupart des LAM sont caractérisées par une hétérogénéité clonale, avec un clone fondateur et au moins un sous-clone (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013). La dynamique de cette hétérogénéité clonale serait à l'origine des rechutes et de la résistance au traitement (Ding et al. 2012). Le séquençage séquentiel de nombreuses LAM a révélé l'existence de cellules souches pré-leucémiques. Les gènes impliqués dans la régulation épigénétique (i.e., *DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH2* et *TET2*) sont fréquemment mutés dans les cellules dites « pré-leucémiques », apparues au début de l'évolution clonale. Ces clones ancestraux, capables de générer plusieurs clones distincts de cellules malades, peuvent survivre aux chimiothérapies et s'amplifier pendant les périodes de rémission, ce qui peut conduire à une rechute, parfois très différente de la maladie initiale (Krönke et al. 2013; Shlush et al. 2014; Corces-Zimmerman et al. 2014).

II. 1. 4 Les syndromes myélodysplasiques / myéloprolifératifs

La mise à jour de 2016 de la classification des hémopathies malignes a confirmé l'individualisation des SMD/SMP associant une dysplasie cellulaire et la prolifération anormale d'au moins une lignée myéloïde (Arber et al. 2016; Vardiman JW, Thiele J 2008). L'OMS reconnaît 5 entités dans cette catégorie d'hémopathies myéloïdes : (1) la leucémie myélomonocytaire juvénile (LMMJ), (2) la LMMC, (3) la leucémie myéloïde chronique atypique (LMCa), (4) le SMD/SMP avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose (SMD/SMP-SC-T) et (5) les SMD/SMP non classables (SMD/SMP-i). Certaines anomalies génétiques doivent être exclues, comme la fusion BCR-ABL1, la fusion PCM1-JAK2 et les réarrangements chromosomiques impliquant PDGFA, PDFGB et FGFR1 car les hémopathies dans lesquelles ces anomalies sont présentes sont réunies dans un groupe distinct.

Les patients atteints de LMCa ont une survie globale plus faible que ceux atteints de LMMC ou d'un SMD/SMP-i tandis que la survie des patients atteints de SMD/SMP-SC-T est plus longue (Patnaik et al. 2016; Wang et al. 2015) (figure 14a) mais ces données restent controversées, sans doute du fait de la rareté de ces maladies : une étude anglaise suggère pourtant qu'il n'y avait aucune différence de survie globale entre LMCa, LMMC et SMD/SMP-i (figure 14b, Roman et al. 2016).



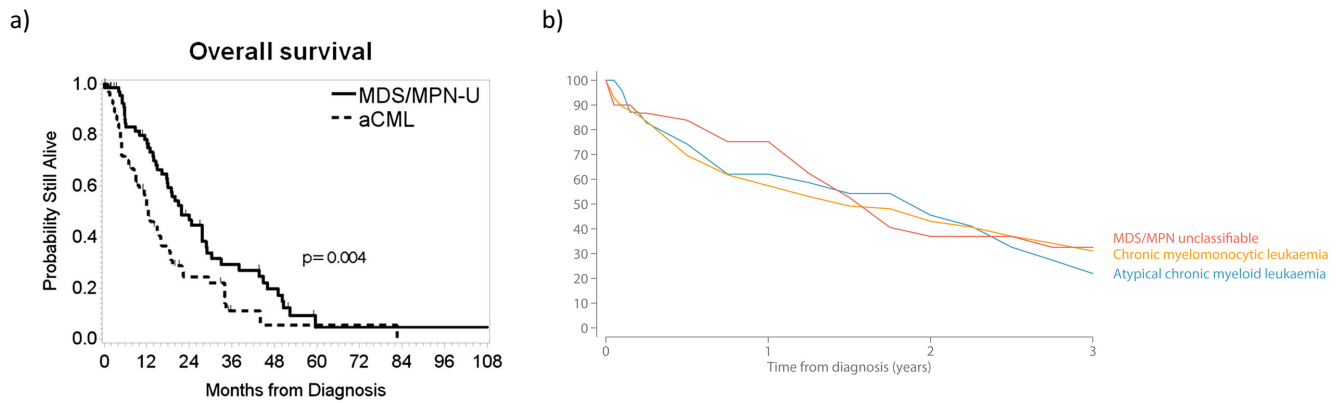


Figure 14 : Courbes des taux de survie dans les syndromes myélodysplasiques/syndromes myéloprolifératifs.

a) Taux de survie : comparé aux SMD/SMP-i, les patients avec une LMCa montrent une diminution significative de la survie globale (12.4 mois, 95% IC [9.0-16.1] vs 21.8 mois, 95% IC [17.6-28.8]) (S. A. Wang et al. 2015) (numéro de licence : 501315830). b) 3 ans de suivi avec estimation de la survie au sein des SMD/SMP (Roman et al. 2016) (licence CC-BY).

A l'exception de la LMMJ qui est une pathologie typiquement pédiatrique, les SMD/SMP émergent chez les sujets âgés. La LMMJ est une RASopathie qui survient après l'acquisition mutations « de novo » ou dans le contexte de syndromes de prédisposition (syndrome de Noonan, neurofibromatose). Les LMMJ peuvent progresser en LAM (33% des cas) ou, beaucoup plus rarement (10%) régresser spontanément (Rauen 2013). Les autres SMD/SMP sont liés à l'âge et combinent des mutations dans des gènes épigénétiques, de l'épissage et de la signalisation (figure 15).

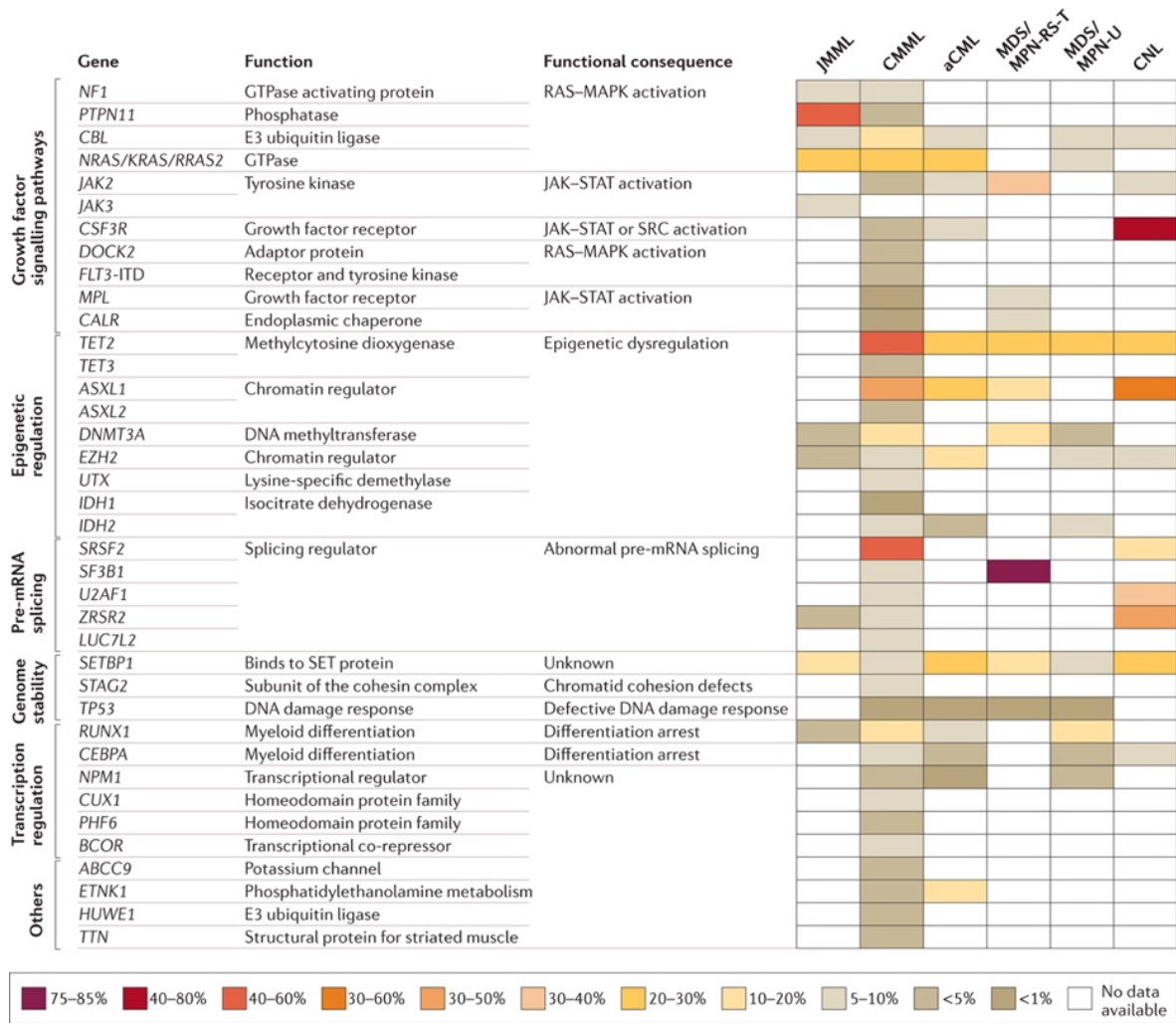


Figure 15 : Fréquence des mutations somatiques dans les syndromes myélodysplasiques/syndromes myéloprolifératifs.

La fréquence de mutations somatiques dans chaque SMP/SMD est montrée et groupée selon leur fonction : ABCC9, *ATP-binding cassette sub-family C member 9*; aCML, *atypical chronic myeloid leukaemia*; ASXL, *additional sex comb-like*; BCOR, *BCL6 co-repressor*; CALR, *calreticulin*; CEBPA, *CCAAT/enhancer binding protein α*; CMML, leucémie myélomonocytaire chronique; CSF3R, *granulocyte colony-stimulating factor 3 receptor*; CUX1, *cut-like homeobox 1*; DNMT3A, *DNA methyltransferase 3A*; DOCK2, *dedicator of cytokinesis protein 2*; ETNK1, *ethanolamine kinase 1*; EZH2, *enhancer of zeste 2*; FLT3-ITD, *tyrosine kinase 3-internal tandem duplication*; IDH, *isocitrate dehydrogenase*; JAK, *Janus kinase*; JMML, leucémie myélomonocytaire juvénile ; LUC7L2, *LUC7-like 2, pre-mRNA splicing factor*; MDS/MPN-RS-T, SMD/SMP avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose; MDS/MPN-U, SMD/SMP inclassifiable; MPL, gene codant pour le récepteur à la thrombopoïétine; NF1, *neurofibromin 1*; NPM1, *nucleophosmin*; PHF6, *PHD finger protein 6*; PTPN11, *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*; RAS2, aussi connu comme TC21; RUNX1, *runt-related transcription factor 1*; SETBP1, *SET-binding protein 1*; SF3B1, *splicing factor 3b subunit 1*; SRSF2, *serine- and arginine-rich splicing factor 2*; STAG2, *stromal antigen 2*; STAT, *signal transducer and activator of transcription*; TET, *tet methylcytosine dioxygenase*; TTN, *titin*; U2AF1, *U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*; UTX, *also known as KDM6A*; ZRSR2, *zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine-rich 2* (Deininger, Tyner, and Solary 2017) (numéro de licence : 4198911135746).



II. 2 Caractéristiques cliniques

Le diagnostic de la LMMC repose sur deux critères: la présence d'une monocytose supérieure à $1 \times 10^9/L$ et des monocytes représentant plus de 10% des leucocytes (Arber et al. 2016). Cette pathologie est très hétérogène dans ses symptômes, son histoire naturelle, son diagnostic ainsi que dans la réponse aux traitements. Malgré cela, deux types de LMMC sont identifiés : les LMMC de « type prolifératif » (leucocytose supérieure à $13 \times 10^9/L$) et les LMMC de « type dysplasique » (leucocytose inférieure à $13 \times 10^9/L$). Les LMMC de « type prolifératif » sont associées à la présence fréquente de mutations dans des gènes de la signalisation RAS/MAPK (Ricci et al. 2010; Schuler et al. 2014; Cervera et al. 2014), entraînant une hypersensibilité des progéniteurs granulo-monocytaires au GM-CSF, attestée par la phosphorylation de STAT5 (Padron et al. 2013). Le pourcentage de myéloblastes a aussi une importance pronostique reconnue par l'OMS qui distingue 3 catégories : LMMC-0 (< 2% de myéloblastes dans le sang et < 5% de myéloblastes dans la moelle osseuse), LMMC-1 (2-4% de myéloblastes dans le sang et 5-9% dans la moelle osseuse) et LMMC-2 [5-19% de myéloblastes dans le sang et 10 à 19% de myéloblastes dans la moelle osseuse, (Arber et al. 2016)]. La médiane de l'âge au moment du diagnostic est de 72 ans.

Morphologiquement, les monocytes et les polynucléaires des patients atteints de LMMC ont une apparence parfois dysplasique, en particulier les cellules granuleuses sont immatures et dégranulées (R Itzykson and Solary 2013). Chez certains patients, une partie des cellules identifiées comme des monocytes se révèlent être des granulocytes immatures dysplasiques appartenant au clone. Ces cellules se comportent comme des *myeloid-derived suppressive cells* (MDSC) et possèdent diverses capacités immunosuppressives comme la sécrétion de grandes quantités de peptides α -défensines capables d'inhiber la différenciation des monocytes en interagissant avec le récepteur P2Y6 (Droin, Jacquelin, et al. 2010) et de la capacité de supprimer l'activité des lymphocytes T autologues via la production de radicaux libres de l'oxygène (Droin, Itzykson, et al. 2010).

On distingue trois types de monocytes: classiques, intermédiaires et non classiques [figure 16a, $CD14^+/CD16^-$, $CD14^+$, $CD16^+$ et $CD14^{low}/CD16^-$, respectivement (Ziegler-Heitbrock et al. 2014)]. Après stimulation par des lipopolysaccharides (LPS), les monocytes classiques produisent de grandes quantités de *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *interleukin-10* (IL-10), *C-C motif ligand 2* (CCL2), *interleukin-6* (IL-6) et de protéines inflammatoires S100. L'expansion des monocytes non-classiques se produit la plupart du temps après une infection ou



une inflammation. Ces monocytes non-classiques produisent une quantité élevée de cytokines pro-inflammatoires comme le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) et l'*interleukin-1 beta* (IL-1 β). Les monocytes intermédiaires produisent très peu de cytokines mais expriment très fortement les antigènes d'histocompatibilité de type II à leur surface.

Les patients atteints de LMMC présentent une augmentation de la fraction des monocytes classiques au détriment des monocytes intermédiaires et non-classiques (Selimoglu-Buet et al. 2015). Cette répartition anormale permet de distinguer rapidement et efficacement la LMMC d'autres pathologies parfois proches du point de vue clinique, comme les monocytozes réactionnelles (figure 16b). Ce diagnostic, basé sur un taux de monocytes classiques de plus de 94% des monocytes circulants, permet d'obtenir une spécificité de 95,1%, une sensibilité de 91,9% avec une aire sous la courbe de spécificité/sensibilité (courbe ROC) de 0.977 [95% IC, 0.96-0.995, figure 16c, (Selimoglu-Buet et al. 2015)]. L'incidence de la LMMC est entre 3.5 et 4.1/1 000 000 par an aux Etats-Unis et en Europe (Guru Murthya, Dhakalb, and Mehtac 2017; Srour et al. 2016; Maynadie et al. 2011; Sant et al. 2010).

Dans la continuité de leurs travaux et avec les mêmes paramètres, Selimoglu-Buet et al. ont montré que 35% des SMD « pré-LMMC » ont une augmentation significative du nombre de leucocytes et de monocytes SMD avaient une augmentation significative du pourcentage de monocytes classiques dans le sang. Ces comparativement aux autres SMD. En moins d'un an de suivi, 44% des patients SMD « pré-LMMC » ont évolué en LMMC (Selimoglu-Buet et al. 2017).



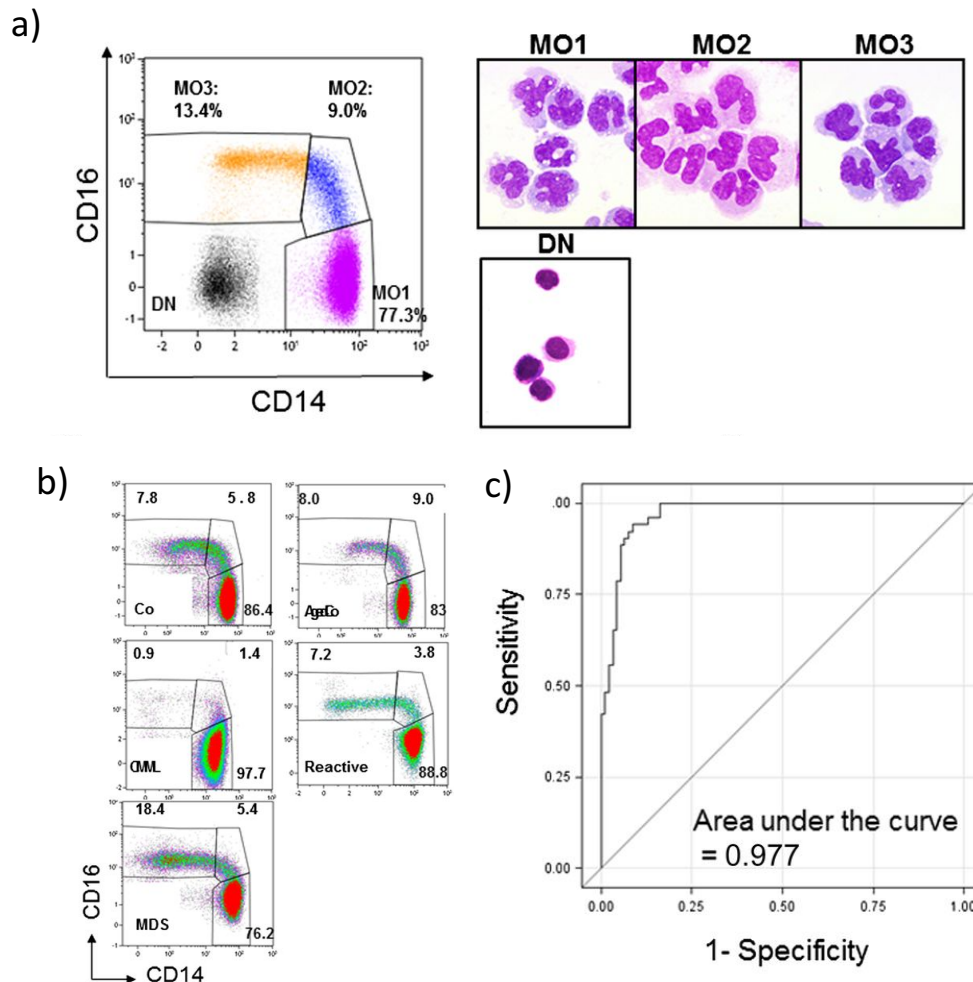


Figure 16 : Représentation graphique en cytométrie de flux et en photos des trois populations monocytaires ainsi que la courbe ROC de diagnostic de la leucémie myélomonocytaire chronique.

a) Cytométrie de flux sur des cellules mononucléées du sang périphérique provenant d'un donneur sain avec marqueurs : anti-CD45, -CD24, -CD14, -CD16, -CD56, -CD115, -CD62L, -CD64, -CCR2, and -CX3CR1. Les monocytes ont été identifiés en utilisant une stratégie de « fenêtres d'exclusions ». Les différents types de monocytes à droite ont été tout d'abord triés puis colorés avec la coloration de May-Grünewald-Giemsa, MO1 : monocytes classiques, MO2 : monocytes intermédiaires, MO3 : monocytes non-classiques et DN : cellules doubles négatives. b) Représentation multi-couleurs de différents donneurs. Co : sang périphérique de contrôle, AgedCo : sang périphérique de contrôle ayant plus de 70 ans, CMML : leucémie myélomonocytaire chronique, Reactive monocytose réactive, MDS : syndrome myélodysplasique. c) Courbe ROC (aussi appelée courbe de spécificité/sensibilité) du pourcentage de MO1 dans les monocytes de sang périphérique établie sur une cohorte d'apprentissage [(contrôles jeunes et âgés, autres hémopathies malignes, monocytozes réactives et LMMC, (Selimoglu-Buet et al. 2015)] (numéro de licence : 501315832)

II. 3 Génétique

Les patients atteints de LMMC ont en moyenne 500 mutations somatiques dans leur génome dont 14 dans des séquences codantes (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Gelsi-Boyer, et al. 2013; Merlevede et al. 2016; Meggendorfer et al. 2012). Les gènes fréquemment mutés peuvent être regroupés en quatre grandes catégories : 1) les gènes de l'épigénétique (TET2, ASXL1, EZH2, DNMT3A), les gènes de l'épissage (SRSF2, ZRSR2, SF3B1 et U2AF1), les gènes de signalisations (CBL, KRAS, NRAS et JAK2) et les autres (RUNX1, PHF6, BCOR et ETNK1) (figure 17). Les mutations de gènes d'une même catégorie sont parfois mutuellement exclusives. Les mutations les plus fréquentes affectent TET2 (60%), SRSF2 (45%), ASXL1 (35%) et les gènes de la voie Ras/MAPK. Aucune n'est spécifique de la maladie, mais plusieurs études ont montré que 9 mutations étaient retrouvées dans plus de 90% des cas (Meggendorfer et al. 2012) et que l'association des mutations TET2/SRSF2 était associée à une monocytose dans plus de 90% des cas (Malcovati et al. 2014).

Ces mutations apparaissent spontanément à cause du stress réplicatif présent dans les CSH de personnes âgés (Merlevede et al. 2016; Mason et al. 2016). Les mutations s'accumulent de façon linéaire et les anomalies génétiques dans des gènes de l'épigénétique ou de l'épissage précèdent, la plupart du temps, l'apparition d'une mutation dans un gène de la signalisation.

Ce paysage génétique reflète mal l'hétérogénéité clinique de la maladie (Ball, List, and Padron 2016)

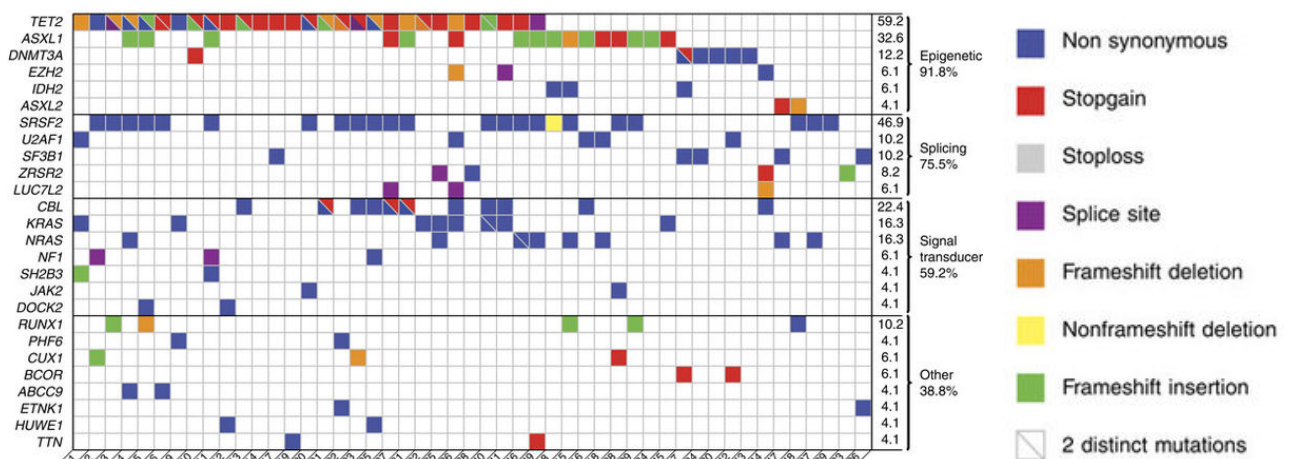


Figure 17 : Représentation graphique des 36 gènes retrouvés fréquemment mutés dans la leucémie myélomonocytaire chronique.

Sur 36 gènes identifiés comme fréquemment mutés en *whole-exome sequencing* (WES), 26 sont transcrits dans les cellules CD14+ et les cellules CD34+. Ces 26 gènes mutés de manière récurrente ont été classés selon leur fonction. Les couleurs indiquent le type de mutation. Deux couleurs séparées par un slash indiquent qu'il y a deux mutations distinctes dans le même gène (Merlevede et al. 2016) (licence CC-BY).

Des études moléculaires et fonctionnelles suggèrent qu'au moins 2 mécanismes distincts peuvent conduire à l'expansion de la lignée granulo-monocytaire qui est le critère clinique phare de la LMMC. Le premier a été identifié grâce aux cultures en méthylcellulose et à la cytométrie en flux. Ces deux méthodes ont permis de mettre en évidence l'hypersensibilité des progéniteurs myéloïdes au GM-CSF associée à une augmentation de l'expression de la forme phosphorylée, active, de STAT5. Ce mécanisme opère surtout dans les LMMC ayant une mutation dans une voie de signalisation [30-50% des cas de LMMC, (Geissler et al. 2016; Padron et al. 2013; Itzykson et al. 2012)] et généralement, ces cas correspondent aux LMMC de « type proliférative ». Le deuxième mécanisme a été suggéré par des travaux sur des modèles murins et l'analyse *in vitro* de cellules primaires issues de patients. Ces travaux suggèrent que la dominance précoce des clones ayant une mutation dans TET2 dans le compartiment des progéniteurs immatures multipotents entraîne un biais significatif vers la lignée granulo-monocytaire ainsi qu'une érythropoïèse inefficace. Ce phénotype rappelle fortement le phénotype retrouvé dans les LMMC de « type dysplasique » [figure 18, (Madzo et al. 2014; Itzykson & Solary 2013)]. Des mécanismes autonomes non-cellulaires impliquant un dialogue entre les cellules clonales différenciées et les CSHs clonales ou entre les cellules leucémiques et le microenvironnement pourraient aussi contribuer à la genèse de la pathologie. Par exemple, la déficience de TET2 dans les macrophages entraîne une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β (Fuster et al. 2017) qui pourrait contribuer à l'expansion des cellules leucémiques (Carey et al. 2017).

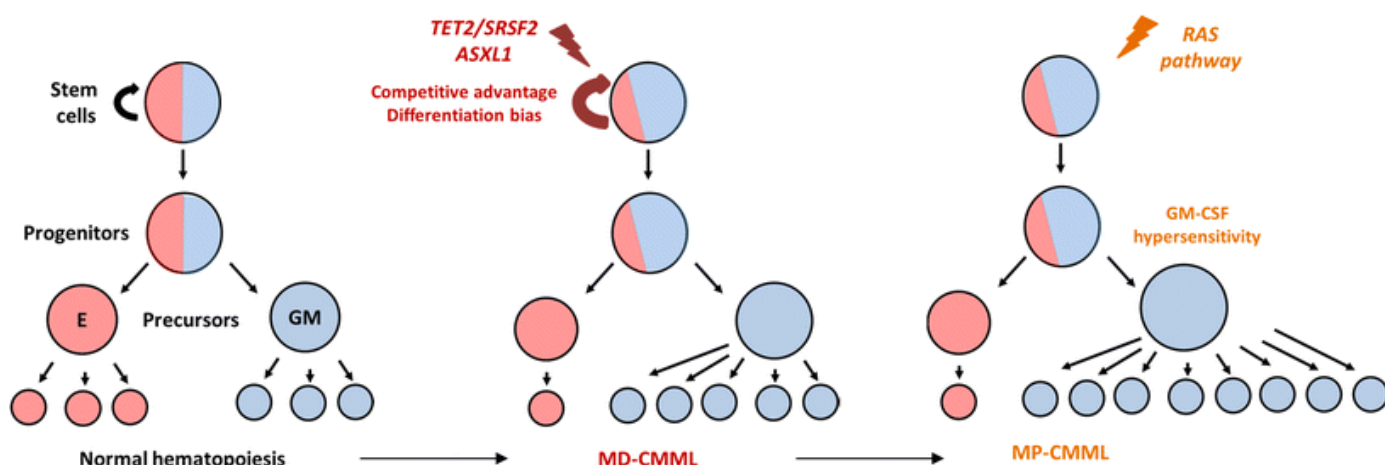


Figure 18 : Modèle de la pathogénèse de la leucémie myélo-monocytaire chronique.

Modèle de la pathogénèse des LMMC dû à un biais des progéniteurs immatures multipotents vers la lignée granulo-monocytaire et l'hypersensibilité des progéniteurs myéloïdes au GM-CSF. (Raphael Itzykson et al. 2017) (numéro de licence : 501315833)

II. 4. 1 SRSF2

L'épissage des ARN pré-messagers (ARNpm) est essentiel à la maturation de plus de 90% des gènes contenant plus d'un exon en ARN messager (ARNm) mature avant leur traduction en protéine (Q. Pan et al. 2008; E. T. Wang et al. 2008). La première fonction de l'épissage est d'enlever les séquences non-codantes, les introns. Ce processus est effectué par deux très grosses machines macromoléculaires connues sous le nom de *major spliceosome* et de *minor spliceosome* (Wahl et al. 2009). Le *major spliceosome* est composé de 5 complexes de petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNPs), U1, U2, U4, U5 et U6 qui sont responsables de l'excision de plus de 99% des introns humains. Le *minor spliceosome* contient les snRNPs U5, U11, U12, U4atac et U6atac, ces derniers étant des analogues fonctionnels des snRNPs du *major spliceosome* (revue dans Turunen et al. 2013).

L'excision des introns est facilitée par de petits motifs de séquences dans l'ARNpm, en particulier à la limite entre l'exon et l'intron en amont (site d'épissage en 5') et entre l'intron et l'exon en aval (site d'épissage en 3', figure 19a). L'épissage lui-même est catalysé par l'ARN, la reconnaissance du site d'épissage nécessite des interactions ARN-ARN, ARN-protéines et protéines-protéines. U1 snRNP reconnaît le site et se fixe sur le site d'épissage en 5' alors que U2 snRNP se fixe sur une partie de l'exon proche du site d'épissage en 3', le point de branchement (*branch point*), grâce à l'interaction avec le facteur auxiliaire U2 (U2AFs) qui se fixe au site d'épissage en 3' formant ainsi le complexe U2AF. S'en suit la formation et l'activation du complexe par le recrutement de U4/U6/U5. L'épissage commence par deux réactions séquentielles de transésterification [(Matera & Wang 2014; Wahl et al. 2009), figure 19b].

On distingue des sites d'épissage constitutifs, qui, par définition, sont constamment reconnus en tant que site d'épissage et donc épissés dans l'ARNm mature, et des sites d'épissage alternatifs qui ne sont reconnus que dans certaines conditions et sont présents dans l'ARNm mature. Ces deux catégories utilisent la même machine moléculaire, bien que les sites d'épissage alternatifs requièrent la plupart du temps le recrutement complémentaire de « *trans-acting factors* ». Les transcrits des gènes multi-exoniques sont épissés de manière alternative à lorsqu'un site d'épissage en 5' peut être relié à différents sites d'épissage en 3' (Q. Pan et al. 2008; E. T. Wang et al. 2008). Ces épissages alternatifs sont classés selon la structure de l'épissage de l'ARNm mature (figure 19c).

Comme décrit précédemment, l'épissage alternatif dépend de *trans-acting splicing factors* qui se fixent sur des motifs associés à la promotion (*enhancers*) ou à la répression (*silencers*) de l'épissage. Ces motifs sont dans les introns et les exons et leur effet est le plus fort lorsqu'ils



sont très proches des sites d'épissage (Z. Wang and Burge 2008; Fu and Ares 2014). Diverses protéines se liant à l'ARN se fixent sur ces motifs d'épissage comme les protéines riches en arginines et sérines (protéines SR) et les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes [hnRNPs, (Singh & Valcárcel 2005; Long & Caceres 2009; Zhou & Fu 2013; Krecic & Swanson 1999)].

Les protéines SR possèdent deux parties distinctes : une première contenant un ou deux domaines de reconnaissance à l'ARN (domaine RMM) qui leur permettent de se lier à différents motifs et une seconde contenant un domaine riche en sérine et en arginines (domaine RS) qui contribue à l'interaction protéine-protéine (Zahler et al. 1992; Krecic and Swanson 1999).

Les hnRNPs possèdent aussi deux parties distinctes, une première contenant un domaine RRM et une deuxième relativement peu structurée qui sert probablement à l'interaction protéine-protéine (Ule et al. 2006).

Globalement, les protéines SR promeuvent l'épissage alternatif alors que les hnRNPs le répriment. Cependant des études ont montré que leur rôle était fortement dépendant du contexte. Par exemple, les protéines SR peuvent promouvoir ou réprimer l'épissage selon l'endroit où elles se fixent sur l'ARNpm (Pandit et al. 2013; Han et al. 2011). Certaines hnRNPs peuvent aussi activer l'épissage alternatif selon le contexte (Xue et al. 2009; Llorian et al. 2010; Huelga et al. 2012). Les protéines SR et les hnRNPs régulent l'épissage alternatif de diverses façons comme en facilitant le recrutement de U1 ou U2 snRNP ou en bloquant des sites d'épissage (E. T. Wang et al. 2008; Fu and Ares 2014).

La régulation de l'épissage alternatif joue un rôle essentiel dans la croissance et la différenciation cellulaires et le développement des tissus. De nombreuses études ont trouvé un lien entre la différence d'expression et/ou d'activité des facteurs d'épissage et l'émergence d'une tumeur, la résistance au traitement et la progression tumorale (Zhang & Manley 2013; David & Manley 2010).



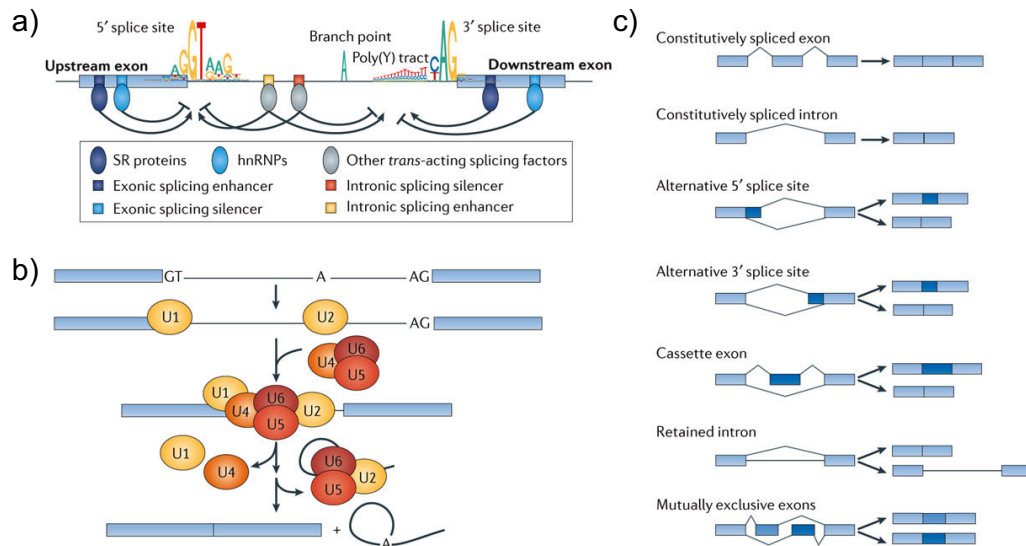


Figure 19 : Représentation graphique de l'épissage alternatif des gènes ainsi que les différentes formes d'épissage alternatif ou constitutif.

a) Les principales séquences qui gouvernent l'épissage sont les séquences consensus des sites d'épissage en 5' et en 3', et les motifs où se lient les *trans-acting splicing factors* (les protéines riches en sérines et en arginine, les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNPs) et les autres). Les éléments de séquences nécessaires à l'assemblage du complexe d'épissage sur l'ARNpm sont les sites d'épissages, la séquence polypyrimidine (poly(Y)) et le point de branchement (*branch point*), suivi la plupart du temps par la séquence consensus. Les séquences consensus sont représentées par des séquences « logos » dans lesquelles la taille de chaque nucléotide représente sa fréquence d'apparition dans les analyses de génome. Les séquences sont illustrées comme des séquences d'ADN génomique plutôt que comme des ARNpm (T à la place du U). b) Schéma simplifié de l'excision d'un intron et de la ligation de deux exons adjacents. Les étapes montrées sont : la reconnaissance des sites d'épissage 5' et 3' par les U1 et U2 complexes de petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNPs), l'assemblage des snRNPs en un complexe d'épissage actif, l'excision de l'intron et la ligation des deux exons. c) Schéma des différentes formes d'épissage constitutifs ou alternatifs. Bleu clair : séquence constitutive qui fait toujours partie de l'ARNm mature ; bleu foncé : séquence alternative qui peut être incluse ou exclue de l'ARNm mature. (Dvinge et al. 2016) (numéro de licence : 4198930094643).

Certaines protéines SR jouent le rôle d'oncoprotéine quand elles sont surexprimées dans un contexte précis. Par exemple, la protéine SR 1 (SRSF1, aussi connue sous le nom de ASF et SF2) est surexprimée dans certains cancers du poumon, du colon, et du sein (Anczuków et al. 2012; Karni et al. 2007). Une légère surexpression de SRSF1 entraîne l'immortalisation de fibroblastes de souris, des fibroblastes humains, et des cellules épithéliales mammaires de souris (Anczuków et al. 2012; Karni et al. 2007). SRSF3 est aussi une oncoprotéine lorsqu'elle est surexprimée (Jia et al. 2010) ce qui concorde avec le fait que la diminution d'expression de SRSF3 augmente la senescence cellulaire en augmentant l'expression de l'isoforme β de la protéine p53 (Tang et al. 2013). Enfin, la surexpression de SRSF6 augmente l'expression de certaines isoformes de la ténascine C, une protéine de la matrice extracellulaire, dans des cancers de la peau invasifs et métastatiques (Jensen, Wilkinson, and Krainer 2014).

Des mutations dans des protéines du complexe d'épissage ont été trouvées initialement



dans les hémopathies myéloïdes (principalement les SMD, Yoshida et al. 2011; Graubert et al. 2011; Papaemmanuil et al. 2011) ainsi que dans la leucémie lymphoïde chronique (L. Wang et al. 2011; Quesada et al. 2011). Les mutations récurrentes le plus souvent répertoriées sont concentrées sur 4 gènes : le facteur d'épissage 3B, sous-unité 1 (SF3B1), le facteur d'épissage 2 riche en sérines et arginines (SRSF2), le facteur auxiliaire 1 de U2 (U2AF1) et la protéine à doigt de zinc avec motif de liaison à l'ARN et motif riche en sérines et arginines [ZRSR2, (Yoshida et al. 2011; Graubert et al. 2011; Papaemmanuil et al. 2011)].

A l'exception des mutations du gène ZRSR2 dont la dispersion suggère une perte de fonction, les mutations des gènes d'épissage affectent des acides aminés précis, suggérant un gain de fonction.

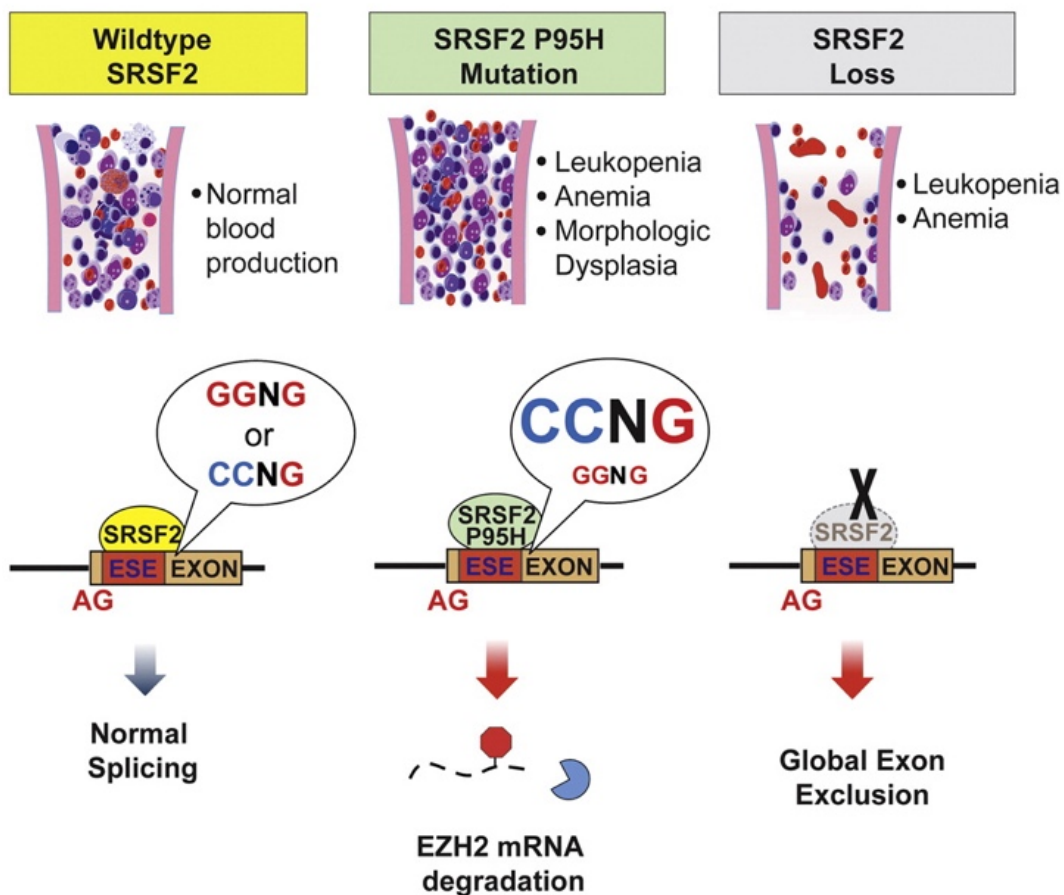


Figure 20 : Résumé graphique du papier de Kim et al. 2015.

Les souris mutées SRSF2^{P95H/sauvage} développent un SMD contrairement aux souris SRSF2^{KO/sauvage}. La mutation de la proline en position 95 change la spécificité de liaison de SRSF2 à certains motifs de *exonic splicing enhancer* (ESE) entraînant l'augmentation de l'expression d'une isoforme d'EZH2. L'augmentation de cette isoforme entraîne la diminution de l'expression d'EZH2. (Kim et al. 2015) (numéro de licence : 4198930238098)

Ces observations suggèrent que SF3B1, SRSF2 et U2AF1 sont des proto-oncogènes alors que ZRSR2 est un suppresseur de tumeur car les mutations de ZRSR2 décalent le cadre de lecture ou introduisent un codon stop prématurément, ce qui inactive la protéine. C'est pourquoi il existe une différence de phénotype entre les souris mutées SRSF2^{P95H/sauvage} qui développent un SMD et



les souris $SRSF2^{KO/sauvage}$ qui n'en développent pas (figure 20). Les mutations des facteurs d'épissage sont mutuellement exclusives, ce qui peut s'expliquer par la redondance fonctionnelle et un effet de létalité synthétique suite à la perte ou d'un changement de fonction d'une seconde protéine du complexe.

Des mutations de SRSF2 sont trouvées dans 40-50% des LMMC (Yoshida et al. 2011). La protéine SRSF2 contribue à la fois à l'épissage alternatif et à l'épissage constitutif des exons en se liant une séquence *exonic splicing enhancer* (ESE) sur l'ARNpm grâce à son domaine RRM (Graveley and Maniatis 1998; Liu et al. 2000; Schaal and Maniatis 1999). Plus de 95% des mutations affectent la proline en position 95 (P95) située entre les domaines RRM et SR. L'étude du transcriptome des CSH de souris mutées $Srsf2^{P95H}$ (Kim et al. 2015) et de cellules de la lignée cellulaire K562 exprimant $SRSF2^{P95H}$ (Jian Zhang et al. 2015) révèle que les mutations $SRSF2^{P95}$ altèrent la reconnaissance du domaine RRM. Les mutants reconnaissent préférentiellement les motifs riches en C (motif CCNG) par rapport aux motifs riches en G (motif GGNG), alors que SRSF2 sauvage se lie aux deux motifs avec la même affinité (Kim et al. 2015; Jian Zhang et al. 2015; Daubner et al. 2012). Ce changement d'affinité pour la reconnaissance de certains motifs entraîne une répression ou une promotion des ESE riches en G ou en C (figure 20). L'altération de la reconnaissance des motifs ESE change l'épissage d'une centaine de gènes (Kim et al. 2015; Jian Zhang et al. 2015). Nombreux de ces gènes mal épissés sont des gènes fréquemment mutés dans les hémopathies myéloïdes, comme EZH2 (Ernst, Chase, Score, et al. 2010; Nikoloski et al. 2010) et BCOR (Frederik Damm et al. 2013). Les mutations $SRSF2^{P95}$ entraînent l'inclusion d'un « exon poison » qui introduit un codon stop prématuré dans l'ARNm EZH2 et diminue l'expression de la protéine et la triméthylation de la lysine en position 27 de l'histone H3 [H3K27me3, (Kim and Abdel-Wahab 2013)]. Des mutations pertes de fonction d'EZH2 ainsi que des pertes d'hétérozygotie sont fonctionnellement liées au développement des SMD (Muto et al. 2013). La diminution de l'expression d'EZH2 pourrait partiellement expliquer comment les mutations ponctuelles de SRSF2 déclenchent des SMD et pourquoi les mutations de SRSF2 sont mutuellement exclusives des mutations d'EZH2 (Haferlach et al. 2014; Elli Papaemmanuil et al. 2013).

En plus de déréguler l'épissage des ARNpm, les mutations dans les protéines d'épissage pourraient affecter directement ou indirectement d'autres processus cellulaires. Par exemple, la déplétion de SRSF1 ou SRSF2 entraîne une instabilité génomique avec une augmentation du nombre de dommages à l'ADN à cause de la formation de boucles hybrides (*R loops*) ARN:ADN (Xialu Li and Manley 2005; Xiao et al. 2007). Un article élégant de Colla et al. montre que le



dysfonctionnement des télomères serait critique pour le développement des SMD. Les souris SRSF2 haploinsuffisantes et les souris SRSF2 mutées ont des altérations de l'épissage des gènes de la maintenance des télomères et récapitulent partiellement un phénotype propre aux SMD. Cependant, les souris SRSF2 mutées et les souris SRSF2 haploinsuffisantes possèdent une différence dans l'épissage des transcrits et les souris SRSF2 mutées possèdent un phénotype de SMD plus fort que les souris haploinsuffisantes (Colla et al. 2015). SRSF2 régule aussi l'élongation transcriptionnelle via le complexe 7SK qui gouverne l'ARN polymérase II *pause release* (Ji et al. 2013).

II. 4. 1 KRAS

Les protéines RAS sont des interrupteurs moléculaires qui transitent entre un état actif lié à la guanosine triphosphate (GTP) et un état inactif lié à la guanosine diphosphate (GDP). Ce mécanisme est très conservé parmi l'ensemble des protéines qui se lient à GDP/GTP. La conversion de l'état stable inactif lié à la GDP à l'état actif lié à la GTP est stimulée par les *guanine nucleotide exchange-factors* (GEFs). Le retour à un état inactif est induit par les *GTPase-activating proteins* (GAPs) (Cherfils and Zeghouf 2013). La dépendance des protéines RAS aux GEFs et aux GAPs est régulée par de nombreux signaux. Mais c'est surtout leur translocation à la membrane qui régule l'activation des protéines RAS. En effet, les GEFs et les GAPs activent ou inactivent RAS quand elles sont recrutées à la membrane cellulaire et placées directement au contact des protéines RAS, ce qui augmente l'interaction entre les protéines de RAS et ses protéines régulatrices de 5 ordres de grandeur.

Parmi les hémopathies malignes, à l'exception de la JMML qui est une RASopathie, la LMMC possède la plus forte incidence de mutations de la voie de signalisation RAS (plus de 50%) (Gelsi-Boyer et al. 2008). Les mutations ont été associées à la prolifération cellulaire et à la monocytose (Onida and Beran 2004) et leur incidence est plus élevée dans les LMMC de « type prolifératif » que celles de « type dysplasique » (Onida and Beran 2004; Gelsi-Boyer et al. 2008).

Parmi toutes les isoformes de RAS, les mutations faux-sens sont les plus fréquentes et sont observées dans KRAS (85%), NRAS (12%) et HRAS (3%) (Revue dans Simanshu et al. 2017). La plupart des mutations se produisent sur les codons 12, 13 et 61. Le remplacement de la glycine en position 12 ou 13 par un autre acide aminé, sauf la proline, entraîne un blocage stérique qui empêche les GAPs d'effectuer l'hydrolyse de la GTP lié aux protéines RAS (Scheffzek et al. 1997). Ainsi, les protéines RAS restent actives plus longtemps (Patricelli et al. 2016) entraînant une hyperactivation des voies RAF/MEK/ERK et PI3K/AKT qui jouent un rôle central dans la



prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (Mitin, Rossman, and Der 2005; Mendoza, Er, and Blenis 2011).

Une surexpression de HRAS^{G12V} dans des fibroblastes humaines et murins entraîne un arrêt permanent du cycle cellulaire en G1, du fait de l'accumulation de P53 et de P16. L'inactivation de P53 et P16 permet de restaurer le phénotype et relance le cycle cellulaire (Serrano et al. 1997). La mutation HRAS^{G12V} bloque la différenciation terminale de la lignée érythroïde mais n'induit pas d'apoptose (Jing Zhang et al. 2003), ce qui explique pourquoi les mutations de RAS sont souvent des événements secondaires dans l'évolution de la LMMC (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013).

La surexpression des formes actives KRAS, NRAS et HRAS, dans la moelle osseuse de souris, induit une hémopathie myéloïde. De manière intéressante, les 3 oncogènes ont des potentiels leucémiques différents. Dans ce modèle, les souris où NRAS est surexprimé développent des pathologies ressemblant à la LMMC ou à la LAM, les souris où KRAS est surexprimé développent des pathologies proches de la LMMC, alors que les souris où HRAS est surexprimé développent des pathologies ressemblant aux LAM, démontrant une agressivité plus forte que les mutations de NRAS ou KRAS (Parikh, Subrahmanyam, and Ren 2007). L'expression de KRAS^{G12D} dans les cellules myéloïdes de souris induit une myéloprolifération évoquant une LMMC ou une JMML. La mutation KRAS^{G12D} induit un fort avantage prolifératif dans les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques murines (Sabnis et al. 2009). La surexpression de NRAS^{G13C} dans des CD34+ de sang de cordon en co-culture avec des MS5 augmente la différenciation myéloïde. Ces cellules CD34+ surexprimant NRAS^{G13C} ont une meilleure prise de greffe et génèrent un plus grand nombre de cellules myéloïdes lorsqu'elles sont injectées à des souris NOD/SCID (Shen et al. 2004).

II. 5 Evolution clonale

Nothing in biology makes sense except in the light of evolution.
—Th. Dobzhansky, 1973

Dans les années 1970, Peter Nowell, codécouvreur du chromosome de Philadelphie, est l'un des premiers à émettre l'hypothèse que les cancers trouvent leur origine dans une seule cellule (Fialkow 1974) dont la descendance se diversifie génétiquement pour générer un ou plusieurs sous-clones ayant un avantage compétitif sur les cellules normales (Nowell 1976). L'étude à



l'échelle unicellulaire des leucémies aiguës lymphoblastiques a révélé une évolution clonale branchée et non linéaire (Anderson et al. 2011). Des patterns similaires ont été observés dans les LAM (Welch et al. 2012; Klco et al. 2014), la leucémie lymphoïde chronique (Shlush et al. 2014) et les mélanomes (Egan et al. 2012). Cette architecture clonale est encore plus prononcée dans les tumeurs solides comme dans les cancers du sein (Yates et al. 2015), les glioblastomes (A. Sottoriva et al. 2013), les cancers de la prostate (Gundem et al. 2015), les cancers rénaux (Gerlinger et al. 2014) ainsi que les cancers colorectaux (Andrea Sottoriva et al. 2015). Dans ces tumeurs, contrairement aux leucémies, les sous-clones sont séparés de manière topographique dans le tissu d'origine (A. Sottoriva et al. 2013; Gerlinger et al. 2012; Boutros et al. 2015), ce qui correspond à l'évolution spatio-temporelle des sous-clones. Les trajectoires ou les évolutions clonales peuvent être représentées à l'aide d'un arbre phylogénétique (figure 21a), similaire à l'arbre de la vie qui apparaît dans *On the Origin of Species by Natural Selection*, 1859 de Darwin (figure 21b, Yates et al. 2015; Sottoriva et al. 2013).

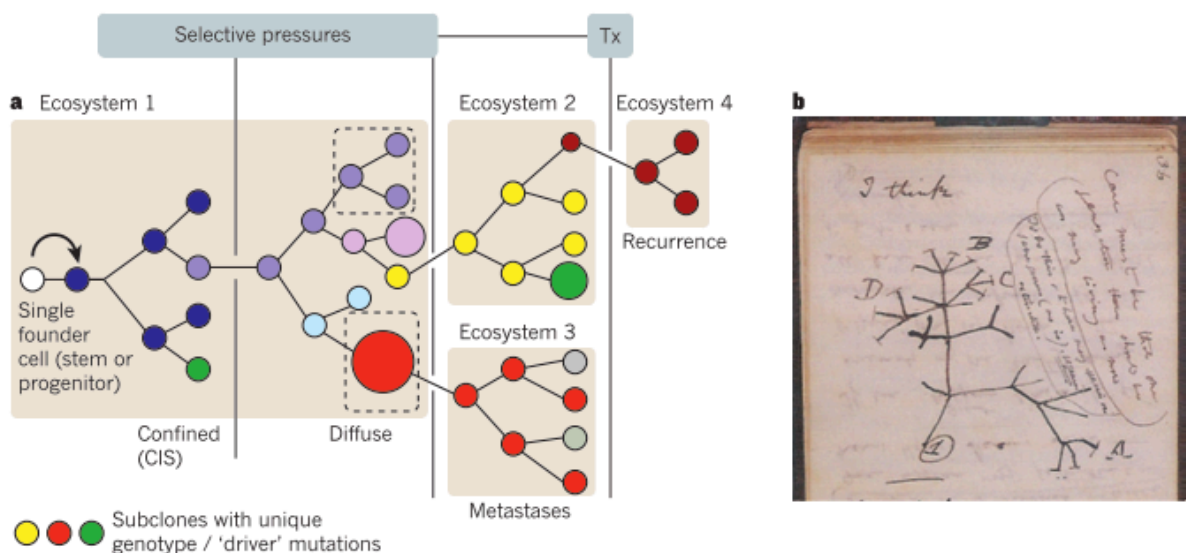


Figure 21 : Représentation graphique de l'évolution d'une architecture clonale branchée et représentation de l'arbre de la vie de Darwin (1837).

L'évolution d'une architecture branchée. a) Clones du cancer. La pression de sélection permet à certains sous-clones mutés de s'expandre pendant que les autres s'éteignent ou restent dormants. Les lignes verticales représentent les contraintes ou les pressions de sélection. Ceci est une représentation du pattern d'évolution classique des cancers solides, comme l'imaginait P. Nowell. Les clones leucémiques pourraient s'expandre plus rapidement (années contre décennies) et être sujets à moins de contraintes et de mutations. Les écosystèmes 1-4 (carrés marrons) représentent les différents écosystèmes des tissus. Chaque cercle de couleur différente représente un sous-clone génétiquement distinct. Tx : thérapie. CIS : à l'intérieur du carcinome. b) Représentation de l'arbre de la vie de Darwin (cahier de 1837, Greaves & Maley 2012) (numéro de licence : 4198930339878)

Dans les années 1990, l'inactivation aléatoire du chromosome X a permis l'observation de la présence d'une hématopoïèse clonale chez 30 à 40% des femmes âgées (Vogelstein et al. 1987; L Busque et al. 1996; Puck, Stewart, and Nussbaum 1992; Gale, Wheadon, and Linch 1992).

L'origine de ce phénomène a été révélée en 2014 quand plusieurs équipes ont trouvé un très faible niveau de mutations somatiques dans des cellules de donneurs sains (Genovese et al. 2014; McKerrell et al. 2015; Xie et al. 2014; Jaiswal et al. 2014). Les 3 mutations les plus fréquemment trouvées dans ces cellules clonales (on parle d'hématopoïèse clonale liée à l'âge ou ARCH) sont DNMT3a, TET2 et ASXL1 (Genovese et al. 2014; Jaiswal et al. 2014; Lambert Busque et al. 2012). Des mutations dans d'autres gènes ont été retrouvées à un plus faible fréquence comme JAK2, SFB1 et SRSF2 (McKerrell et al. 2015; Jaiswal et al. 2014; Mason et al. 2016). Les ARCH sont associées à un plus grand risque de développer une hémopathie maligne ou une maladie cardiovasculaire (Jaiswal et al. 2014). Au cours du vieillissement, l'accumulation de modifications du génome, d'altérations des mitochondries, de dommages à l'ADN et de signes d'inflammation (Beerman et al. 2013; Garrison and Rossi 2012) favorise l'expansion lente de la lignée myéloïde au détriment de la lignée lymphoïde (Pang et al. 2011; Nilsson et al. 2016; Grover et al. 2016).

Au cours de la vie, les cellules somatiques acquièrent des mutations. Merlevede et al. ont montré, grâce à une étude de séquençage du génome, que les mutations somatiques des LMMC provenaient d'un processus mutationnel lié à l'âge (figure 22, Alexandrov et al. 2015; Merlevede et al. 2016). L'incidence de la LMMC augmente avec l'âge et se voit essentiellement chez des sujets âgés. La maladie apparaît lorsqu'un nombre suffisant de mutations stochastiques s'est accumulé dans les CSHs (Mason et al. 2016). Ces données suggèrent que la LMMC est l'expression d'un biais myélomonocytaire des CSHs âgées résultant d'un processus d'adaptation de ces cellules dans un environnement inflammatoire.

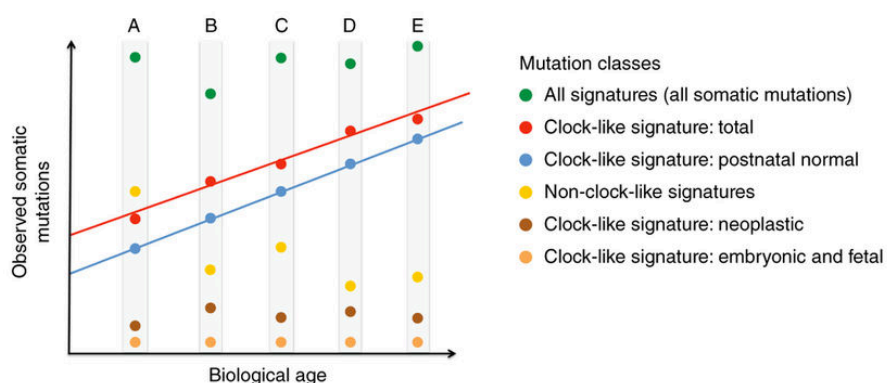


Figure 22 : Accumulation de mutations somatiques au travers du temps avec des signatures « clock-like ».

Accumulation de mutations somatiques dû à des signatures mutationnelles *clock-like* et *non clock-like* dans 5 patients. La corrélation entre l'âge et le nombre de mutations somatiques dû au processus mutationnel *clock-like* ayant lieu dans des cellules normales post-natale est détectable en utilisant les mutations retrouvées dans les cancers. Le taux est relativement non-affecté. Si le nombre de mutations acquis durant la phase embryonnaire, fœtale, et néoplasique est limité alors le taux sera relativement peu affecté. Information complémentaire : Cette figure est une simple illustration du processus mutationnel *clock-like* et n'a pas pour but d'être une représentation réelle d'échantillons de patients. En réalité le nombre de division cellulaire dépendra du tissu et du nombre de mutations qui pourrait être très supérieur. (Alexandrov et al. 2015) (numéro de licence : 4198931117696)

Des analyses de WES de LMMC montrent en moyenne 14 mutations dans les séquences codantes par patient (Mason et al. 2016; Merlevede et al. 2016; Yoshida et al. 2011; Piazza et al. 2012; Ernst, Chase, Zoi, et al. 2010). Plusieurs évidences suggèrent que la mutation TET2 serait la mutation initiale dans la majorité des LMMC. Cette mutation est fréquente [60% des cas, (Smith et al. 2010; Meggendorfer et al. 2012; Jankowska et al. 2011)], y compris dans les ARCH et l'inactivation de TET2 dans ces cellules souches ou progénitrices humaines ou murines génère une surproduction de cellules granulo-monocytaires par rapport aux cellules érythrocytaires et mégakaryocytaires (Pronier et al. 2011; Quivoron et al. 2011; Moran-Crusio et al. 2011), La mutation TET2 est fréquemment le premier événement mutationnel dans les expériences d'analyse génomique à l'échelle unicellulaire (Itzykson et al. 2013).

Ces observations suggèrent un modèle en deux étapes, une première mutation dans TET2 fait émerger une hématopoïèse clonale puis une seconde mutation engendre une différenciation anormale conduisant à une hémopathie myéloïde. Des modèles mathématiques prédisent une longue latence dans les hémopathies myéloïdes chroniques (Vickers 2007) du fait que les mutations TET2, ou les autres mutations récurrentes ne procurent qu'un très faible avantage compétitif aux CSHs mutées. Un avantage compétitif aussi faible (0.4% de fitness) a déjà été décrit avec des mutations *drivers* dans des cancers solides conduisant à une fixation de la mutation *driver* sur une période longue [plus de 10 ans, (Bozic et al. 2010)]. Des mutations procurant un avantage compétitif très faible aux cellules dans lesquelles elles apparaissent peuvent ne pas se fixer et disparaître spontanément (Müller-Schmah et al. 2012).

Dans la LMMC, une relation épistatique pourrait exister entre les mutations de SRSF2 et de TET2. Une mutation dans un gène de l'épissage est observée dans plus de 75% des LMMC, et les mutations dans les divers gènes de l'épissage sont mutuellement exclusives (Merlevede et al. 2016). Dans la LMMC, les mutations de SRSF2 sont très souvent combinées aux mutations de TET2 (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013; Meggendorfer et al. 2012; F Damm et al. 2012). Dans les cellules hématopoïétiques normales, les mutations dans des gènes d'épissage entraînent un défaut de prolifération et un désavantage compétitif *in vivo* (Yoshida et al. 2011). Les mutations de SRSF2 pourraient devenir un avantage que dans un contexte TET2 muté, ce qui expliquerait pourquoi les mutations de TET2 apparaissent souvent en premier (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013).

Dans la plupart des LMMC (figure 23), l'architecture clonale est linéaire, comme dans les SMD et les LAM de novo (Walter et al. 2012; Welch et al. 2012; Jan et al. 2012). Cependant une architecture clonale branchée peut apparaître à partir d'un ancêtre commun à la suite d'une perte



d'hétérozygotie (LOH) au niveau des loci mutés (figure 23). Dans les LMMC, les LOH impliquent, la plupart du temps, une recombinaison mitotique (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013), générant ainsi deux cellules filles, l'une avec une mutation homozygote et l'autre sans la mutation (figure 23). Pour finir, des processus d'interférence clonale sont possibles mais peu fréquents et peuvent aboutir à la création d'une nouvelle branche. Par exemple, lorsque deux mutations « drivers » apportent le même avantage compétitif et apparaissent indépendamment (Lasho et al. 2011). Ceci a notamment été observé dans le papier de Itzykson et al., où l'on observe une compétition entre des clones ayant une mutation dans NRAS ou dans KRAS (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013).

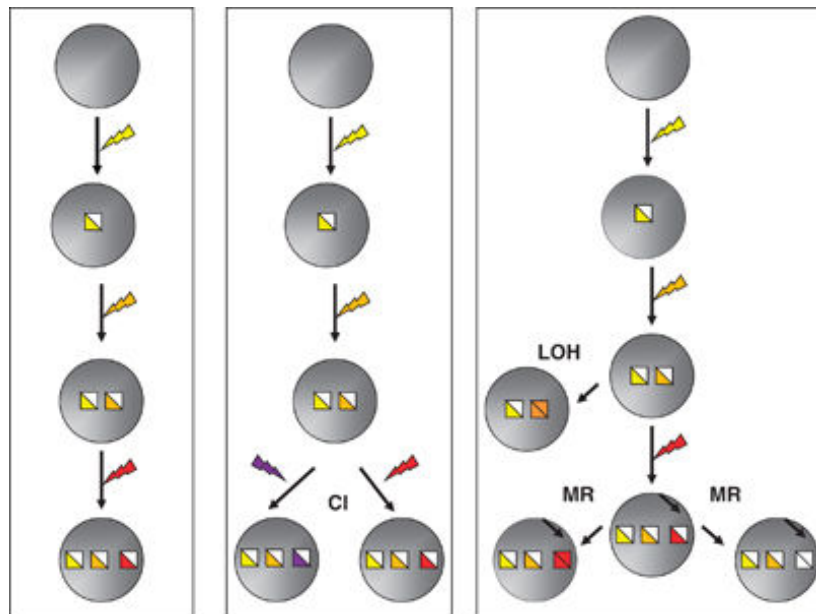


Figure 23 : Représentation de l'architecture clonale dans la leucémie myéломonozytaire chronique.

L'architecture clonale dans la LMMC. Dans la plupart des cas, l'architecture clonale est caractérisée par une accumulation linéaire des mutations (panel de gauche). De rares cas d'interférence clonale (CI) engendrent l'apparition de sous-clones (panel du milieu). Un branchement peut se produire par une perte d'hétérozygotie (LOH) ou par une recombinaison mitotique (MR) d'un locus muté, ce dernier générant deux cellules filles différentes, l'une sans la mutation et l'autre avec les deux allèles mutés (panel de droite). Chaque triangle représente l'allèle d'un gène. Chaque couleur indique un gène distinct. (R Itzykson and Solary 2013) (numéro de licence 4198931220220)

Cette hétérogénéité clonale et la persistance des clones ancestraux dans le compartiment immature peut s'expliquer par 4 hypothèses. Premièrement, les nouvelles mutations pourraient n'apporter qu'un très faible avantage compétitif à ces cellules (Bozic et al. 2010). Deuxièmement, chaque nouvelle mutation pourrait perturber encore plus la signalisation cellulaire ainsi que la transcription, ce qui rendrait ces nouveaux clones moins flexibles (Rozenblatt-Rosen et al. 2012). Plus les mutations s'accumulent, plus les mutations compatibles se réduisent (Patel et al. 2012). Troisièmement, des mutations coopératrices « commensales » pourraient exister entre les sous-clones au travers d'une signalisation paracrine ou via un contact direct cellule-cellule (Inda et al.

2010; M. Wu, Pastor-Pareja, and Xu 2010). Pour finir, les sous-clones mineurs pourraient être plus adaptés dans un contexte de changement d'environnement induit par l'hypoxie ou un traitement (Andrea Sottoriva, Vermeulen, and Tavaré 2011).

II. 6 Modèles

L'identification des mutations somatiques récurrentes dans les SMD/SMP et le développement des techniques de mutagenèse ciblée ont permis la génération de nombreux modèles murins permettant des analyses de génomique fonctionnelle et récapitulant plus ou moins certaines des caractéristiques des SMD/SMP.

Les pertes de fonction de TET2 ont été modélisées en supprimant le gène (Delhommeau et al. 2009). De manière intéressante, malgré une forte occurrence des mutations pertes de fonction de TET2 dans la plupart des hémopathies myéloïdes, les souris TET2^{-/-} développent principalement mais pas exclusivement une pathologie myéloïde évoquant une LMMC de « type prolifératif » avec une splénomégalie, une monocytose et des dysplasies cellulaires (Z. Li et al. 2013; Moran-Crusio et al. 2011). Itzykson et al. ont montré qu'il y avait une dominance clonale précoce de clones possédant des mutations dans TET2 (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013). En revanche les souris ASXL1^{-/-} ou les souris SRSF2^{P95H} développent des pathologies proches des SMD.

Les souris mutées dans la voie RAS comme NRAS, KRAS, SHP2, NF1, FLT3 et CBL développent une hyperprolifération de la lignée myélomonocytaire, une splénomégalie ainsi qu'une hypersensibilité au GM-CSF qui sont des caractéristiques des LMMJ et des LMMC (Chang et al. 2013; Goodwin et al. 2014; Sanada et al. 2009; J. Wang et al. 2011; B. H. Lee et al. 2007)

Certains modèles murins développent de manière inattendue un phénotype proche des LMMC comme, par exemple, les souris XIST^{-/-}. XIST est un long ARN non codant qui est indispensable à l'inactivation du chromosome X. La délétion XIST est suffisant pour générer un SMD/SMP très agressif avec une forte pénétrance chez les souris femelles (Yildirim et al. 2013). Parmi les modèles intéressants et inattendus, les souris NOTCH^{-/-}, les souris CREBBP^{-/-}, NR4A^{-/-}, DIDO^{-/-}, ARID4a^{-/-} ARID4b^{-/-}, TIF1γ^{-/-}, BID^{-/-}, qui développent aussi une monocytose avec d'autres caractéristiques propres aux SMD/SMP (Klinakis et al. 2011; Zimmer et al. 2012; Ramirez-Herrick et al. 2015; Fütterer et al. 2005; M. Y. Wu, Eldin, and Beudet 2008; Aucagne et al. 2011; Zinkel et al. 2003).

Cependant ces modèles monogéniques ne récapitulent pas toutes les caractéristiques cliniques et génétiques retrouvées dans la LMMC. Les modèles de xénogreffe des LAM dans des



souris immunodéprimées a permis l'identification, la caractérisation des CSH leucémiques et le développement de tests précliniques pour l'identification de nouvelles approches thérapeutiques (Goyama, Wunderlich, and Mulloy 2015).

Les modèles de xélogreffe sont moins bien développés. Récemment, Yoshimi et al. et Zhang et al. ont réussi à effectuer des xélogreffes avec les cellules hématopoïétiques provenant de patients atteints de LMMC dans des souris NOD/SCID-Il2rgcnull exprimant des cytokines humaines telles que *stem cell factor* (SCF), GM-CSF et interleukin-3 (IL-3) (NSG-SGM3). Les cellules qui se développent chez ces souris ont des caractéristiques cliniques et génétiques similaires aux échantillons primaires des patients et ces modèles permettent de valider des molécules pharmacologiques. Ces modèles permettent aussi de reproduire l'hétérogénéité clonale retrouvée dans ces pathologies hématopoïétiques. En revanche, les souris NSG-SGM3 expriment trop fortement la cytokine humaine GM-CSF, ce qui masque sans doute l'efficacité de certains traitements (comme les traitements ciblant la voie GM-CSF/STAT5) ou change drastiquement l'hétérogénéité clonale. Le développement de nouvelles souris exprimant des cytokines humaines à des concentrations plus physiologiques, comme les souris MITRG/MISTRG, devraient faciliter la prise de greffe sans pour autant sur-stimuler la signalisation du GM-CSF (Rongvaux et al. 2014).

II. 7 Approches thérapeutiques

Contrairement à d'autres hémopathies malignes, comme la LMC, la LLC, le myélome multiple et les lymphomes malins non Hodgkiniens, les avancées thérapeutiques dans les SMD/SMP restent anciennes et limitées. La transplantation de CSH (TCSH) allogénique est la seule approche curative pour les adultes atteints d'un SMD/SMP. Malheureusement, seule une faible partie des patients sont éligibles du fait de leur âge avancé et des comorbidités. Les rechutes après une TCSH restent élevées et le taux de survie à long-terme est de seulement 30-40% (Eissa et al. 2011; S. Park et al. 2013; Symeonidis et al. 2015). A cause de ces limitations, le management des patients âgés avec un SMD/SMP a longtemps été basé sur des soins palliatifs et des agents cytotoxiques (le plus souvent l'hydroxyurée et la cytarabine) pour contrôler les symptômes associés à l'hyperprolifération de l'une des lignées hématopoïétiques (Mughal et al. 2015).

Les agents hypométhylants 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) et 5-azacytidine (azacytidine) sont la première ligne de traitement dans les SMD à haut-risque non éligibles à la transplantation. Ces deux molécules entrent dans la cellule grâce à 3 transporteurs : hENT/SLC29A, hCNT/SLC28A et SLC15/SLC22. Les deux molécules sont ensuite activées par une série de 3 phosphorylations pour générer le 5-AZA-dCTP, qui peut être incorporé dans l'ADN pendant la phase S. La première



étape de phosphorylation est limitante et catalysée par la deoxycytidine kinase (DCK) pour la décitabine et par la uridine-cytidine kinase (UCK) pour l'azacytidine. Le métabolisme de l'azacytidine est plus complexe car plus de 80% de sa forme active est incorporée dans l'ARN et moins de 20% est convertie de la forme 5-aza-CTP en 5-aza-dCTP par les ribonucleotide reductases avant son incorporation dans l'ADN. Ces deux molécules sont actives dans les LMMC avec un taux de réponse global entre 40 et 70 % et une médiane de survie de 12-22 mois. Parmi les répondeurs, les agents déméthylants n'empêchent pas l'accumulation de nouvelles mutations dans le clone leucémique et ne réduisent pas la fréquence allélique de celui-ci (Merlevede et al. 2016). Même si les agents déméthylants ont un effet cytotoxique, leur effet épigénétique de déméthylation de l'ADN dans les cellules du clone leucémique semble être l'effet principal (Tsai et al. 2012; Braun et al. 2011). La plupart des mutations épigénétiques observées dans la LMMC entraînent une hyperméthylation et un changement d'expression de gènes liés à des modifications épigénétiques (Figueroa et al. 2009).

Afin de d'essayer de détruire les cellules souches cancéreuses, il est nécessaire d'imaginer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Un traitement qui corrigerait l'avantage prolifératif des différents sous-clones durant la différenciation n'altérerait pas nécessairement le succès reproductif dans le compartiment des cellules souches. Idéalement, l'identification d'un événement oncogénique dont les cellules leucémiques seraient dépendantes permettrait d'éradiquer les sous-clones. Cet événement pourrait être une protéine dégradée ou inhibée, ou une perte de fonction d'un gène qui pourrait être ciblée indirectement si une létalité synthétique peut être déclenchée. Cependant, ce type de thérapie ciblée nécessite une réduction drastique du nombre de sous-clones à l'aide d'une cytoréduction non ciblée pour diminuer le risque qu'un sous-clone soit sélectionné lors du traitement ciblé (M. Wu, Pastor-Pareja, and Xu 2010; Ding et al. 2012).

L'inhibition de la voie RAS a été décevante car les cellules leucémiques développent rapidement des mécanismes d'échappement au traitement en substituant la génylation à la farnesylation de NRAS et/ou KRAS (Fiordalisi et al. 2003). De plus, l'inhibition de la liaison entre RAF et d'autres protéines effectrices de RAS, le rigosertib, n'a pas augmenté la survie des patients ayant un SMD (Garcia-Manero et al. 2016; Athuluri-Divakar et al. 2016). Une nouvelle approche est l'inhibition de l'acyl-protein thioésterase 1 (APT1) qui empêche la prolifération des cellules mutées NRAS^{G12D} en inhibant le cycle palmitoylation-depalmitoylation de NRAS (Xu et al. 2012). Cependant, cibler les voies de signalisation dans les SMD/SMP ne semble pas être efficace et n'a pas généré d'avancée thérapeutique majeure. Ceci pourrait être dû au fait que les mutations des



voies de la signalisation sont souvent des événements tardives dans le développement de ces SMD/SMP.

Par rapport, aux mutations de la signalisation, les mutations dans les gènes de l'épissage sont acquises tôt dans l'évolution de la pathologie ce qui pourrait être une opportunité pour éradiquer le clone fondateur et tous les sous-clones. De plus, les mutations dans les gènes d'épissage tels que SRSF2, SF3B1 et U2AF2 sont les mutations les plus fréquentes dans les SMD (Yoshida et al. 2011; E. Papaemmanuil et al. 2011; Graubert et al. 2011) et fréquentes dans les SMD/SMP à l'exception les LMMJ. De manière intéressante, les mutations touchant les gènes de l'épissage sont exclusives et strictement hétérozygotes suggérant une forte pression de sélection négative contre l'inactivation du second allèle et suggérant une faible tolérance des cellules à un épissage des gènes anormal. Une récente et élégante étude de Lee et al. a montré qu'un inhibiteur de l'épissage, le E7107, prolonge la survie de souris greffées avec des cellules MLL-AF9⁺ ;SRSF2^{+/-} mais pas la survie des souris greffées avec des cellules MLL-AF9⁺ ;SRSF2^{+/+} (S. C.-W. Lee et al. 2016). Cependant, pour que les cellules non mutées reprennent l'avantage, l'inhibiteur E7107 doit être dosé avec précision pour éviter l'inhibition totale de la machinerie de l'épissage.



III. Les cellules pluripotentes induites

Les cellules souches sont définies par leur potentiel de différenciation et leur capacité d'auto-renouvellement. Les cellules souches embryonnaires sont triées à partir de tissus embryonnaires ou post-nataux et sont classées en fonction de leur potentiel de développement (figure 24). Les cellules du zygote et des blastomères sont totipotentes (Kelly 1977) : elles peuvent donner naissance à n'importe quel tissu embryonnaire et extra-embryonnaire. Ce potentiel n'est pas conservé *in vitro*. Les cellules souches pluripotentes (CSP) peuvent former les 3 feuillets embryonnaires que sont l'ectoderme, le mésoderme, et l'endoderme mais ne contribuent que très faiblement à la formation des membranes et du placenta extra-embryonnaire. Les cellules souches multipotentes, comme les CSH, ne peuvent générer, dans des conditions normales physiologiques, que les cellules matures de leur tissu. Les cellules souches unipotentes, telles que les cellules souches spermatogoniales, ont une faible capacité d'auto-renouvellement et ne peuvent donner naissance qu'à un seul type de cellules, les spermatozoïdes.

Les premières CSP ont été obtenues à partir de blastocystes de souris. Leur étude a prouvé que les CSP pouvaient être amplifiées *in vitro* sans limite (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Puis des CSP ont aussi été obtenues de primates non-humains et d'embryons humains (James A Thomson et al. 1998; J A Thomson et al. 1995). Finalement, les cellules somatiques ont été reprogrammées en cellules pluripotentes par l'expression ectopique de facteurs de transcription (Takahashi and Yamanaka 2006). Les propriétés des CSP dépendent de leur tissu d'origine et de leurs conditions de culture. Les CSP humaines expriment des marqueurs moléculaires similaires aux cellules souches épiblastiques (EpiSCs) et sont classées en tant que CSP engagées (figure 24).



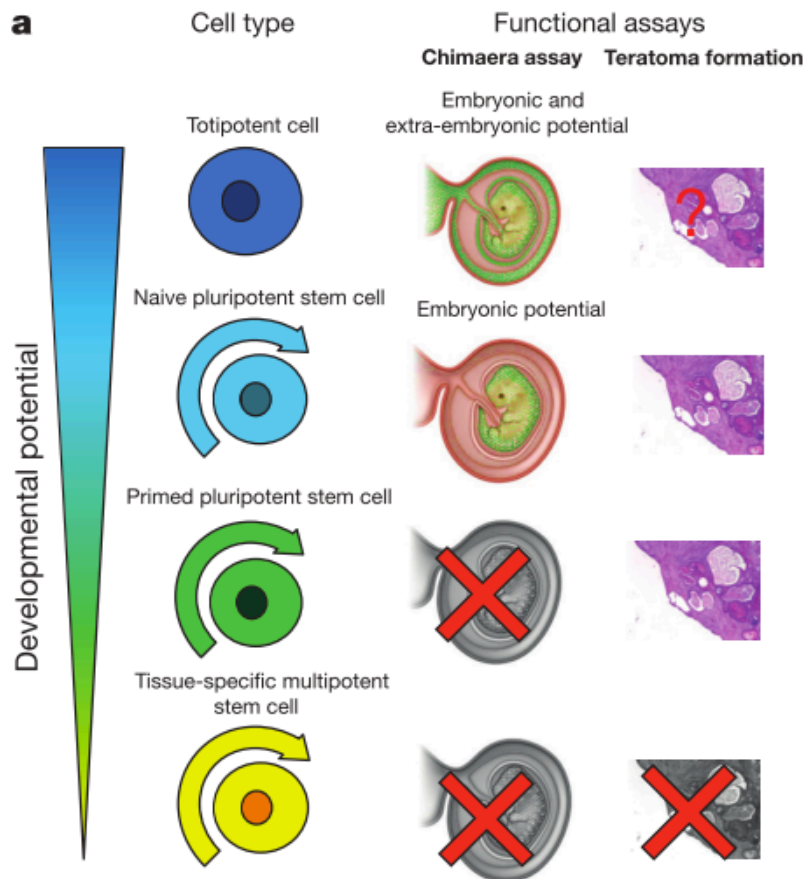


Figure 24 : Représentation graphique montrant les différents potentiels de pluripotence.

Les deux expériences démontrant la pluripotence des cellules souches sont le chimérisme blastocytaire et la formation de tératomes. Selon la performance des cellules souches pluripotentes, elles seront classées en tant que cellules totipotentes, cellules pluripotentes naïves, cellules pluripotentes engagées ou cellules multipotentes. (De Los Angeles et al. 2015) (numéro de licence : 4198931370405)

III. 1. La différenciation hématopoïétique

Durant l'embryogénèse des mammifères, le développement hématopoïétique se produit en 2 vagues. L'hématopoïèse embryonnaire ou primitive prend place dans le sac vitellin et génère principalement des cellules myéloïdes et des érythrocytes nucléées (Orkin and Zon 2008). Le système hématopoïétique primitif est ensuite remplacé par les CSH adultes intra-embryonnaires pour générer une hématopoïèse définitive. Les premières CSH définitives sont détectées au stade embryonnaire, au jour 10.5, au niveau de l'aorte-gonade-mésonephros. Ces CSH émergent d'une petite population de cellules endothéliales « hemogénique » à la suite d'une transition endothélio-hématopoïétique. Ensuite, ces CSH définitives migreront dans le foie fœtal, le sac vitellin et le placenta (Bertrand et al. 2010; Boisset et al. 2010). Pour commencer à y produire l'ensemble des cellules du sang de l'embryon (Orkin and Zon 2008). De nombreux groupes se sont concentré sur le développement de modèles récapitulant de manière précise et reproductible le développement du système hématopoïétique *in vitro* et *in vivo*. Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs)



offrent une nouvelle opportunité d'étudier le système hématopoïétique à l'aide de différents systèmes (résumé dans la figure 25) :

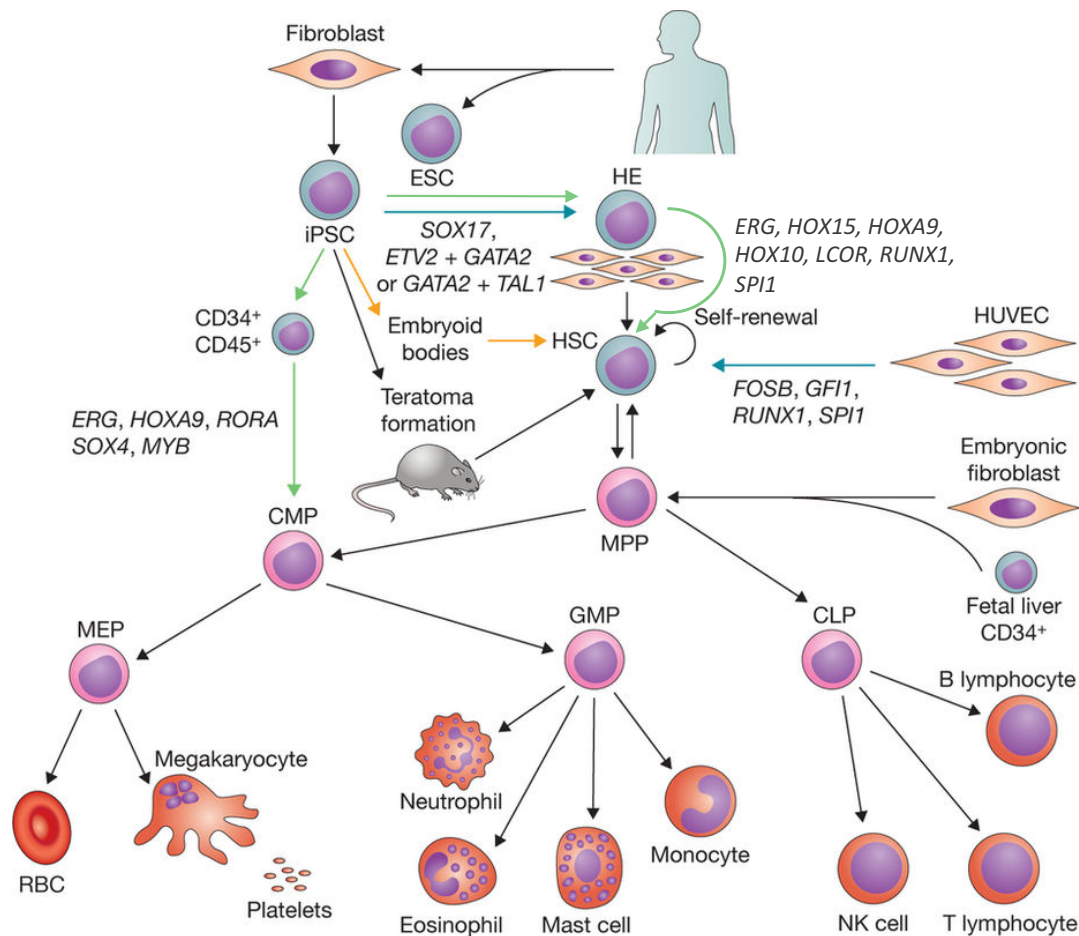


Figure 25 : Illustration des stratégies actuelles pour génération de cellules souches hématopoïétiques humaines.

Les flèches orange représentent la stratégie de différenciation dirigée. Cette stratégie a pour but de récapituler le développement hématopoïétique *in vitro* grâce à l'ajout séquentiel de différentes cytokines et de morphogènes. Les flèches bleues représentent la stratégie de conversion directe permettant de changer « le destin cellulaire » d'une cellule directement vers notre cellule d'intérêt grâce à l'expression de facteurs de transcription clés. Les flèches vertes représentent la stratégie hybride qui combine la différenciation dirigée et la conversion directe (adaptée de Wahlster and Daley 2016).

- **Isolation à partir de teratoma *in vivo*** : Amabile et al. et Suzuki et al. ont réussi à isoler des cellules CD34+ CD45+ à partir de tératomes formés après une injection sous-cutanée d'iPSC indifférenciées. Dans la première étude, malgré une faible prise de greffe, les CSH générées étaient capables de greffer et de reconstituer l'hématopoïèse. La seconde étude montrait que l'injection de cellules stromales avec les iPSC augmentait l'efficacité de la méthode (Amabile et al. 2013; Suzuki et al. 2013);
- **La différenciation dirigée (approche antérograde)** : Comme écrit précédemment, l'hématopoïèse primitive est transitoire et est caractérisée par des érythrocytes nucléés et une majorité de cellules myéloïdes (Orkin and Zon 2008) alors que l'hématopoïèse



définitive, qui est dépendante des CSH situées dans le foie fœtal et la moelle osseuse, est caractérisée par une lymphopoïèse et par une capacité d'auto-renouveau de long terme (Slukvin 2013; Orkin and Zon 2008). En plus de manipulations génétiques, la différenciation dirigée est basée sur l'ajout de manière séquentielle de différentes cytokines ou de morphogènes tels que *Bone Morphogenetic Protein 4* (BMP4), *Activin A* et de *NOTCH ligands* ou sur un système de co-culture dans le but de mimer la niche hématopoïétique (Ledran et al. 2008; Pick et al. 2007; Chadwick et al. 2003). Cependant, les CSPH générées par ces systèmes ne permettent pas de faire des greffes sériees ni de produire une lymphopoïèse caractéristique des CSH définitives. Les travaux de l'équipe de Gordon Keller ont montré que l'hématopoïèse primitive était dépendante de la voie de signalisation Activin-nodal (M. Kennedy et al. 2012), et inversement, l'inhibition de la voie de signalisation Activin-nodal et l'activation de la voie de signalisation Wnt-beta-catenin promouvaient l'hématopoïèse définitive [figure 26, (Sturgeon et al. 2014)]. Cependant, ces différentes stratégies *in vitro* conduisent à une production de cellules hématopoïétiques définitives mais non pas réussi à produire une *bona fide* CSH (M. Kennedy et al. 2012; Sturgeon et al. 2014);

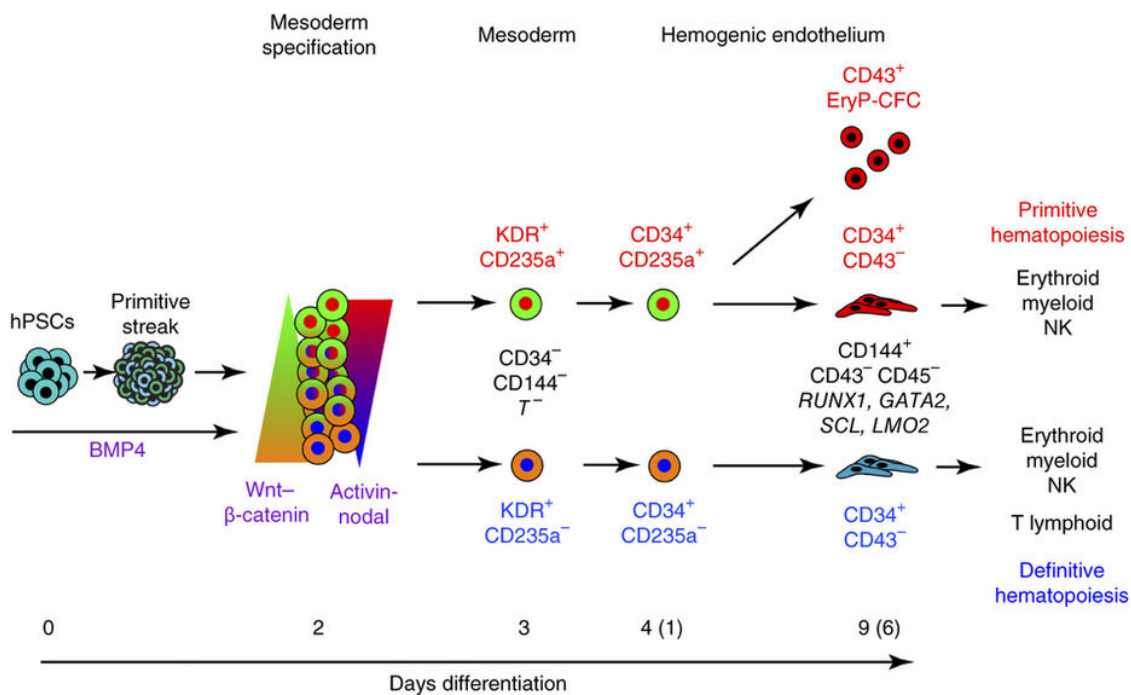


Figure 26 : Le rôle de la voie Wnt-beta-catenin et Activin-nodal dans l'hématopoïèse primitive et définitive.

Après la formation d'une couche de cellules primitives, la conversion de ces cellules en cellules mésodermiques KDR⁺ CD235a⁺ est spécifiée par l'activation de la voie de signalisation activin-nodal et l'inhibition de la voie Wnt, alors que l'activation de la voie Wnt-beta-catenin induit la formation de cellules mésodermiques définitives KDR⁺ CD235a⁻. Les cellules KDR⁺ CD235a⁺ donnent rapidement (6 jours) naissance à une expansion de cellules hématopoïétiques primitives, marqué par l'émergence d'une population CD43⁺. En revanche, les cellules mésodermiques KDR⁺ CD235a⁻ ne donnent pas naissance durant cette même période. Après encore 6 jours de culture, les cellules mésodermiques CD34⁺ CD43⁻ donnent naissance à des cellules hématopoïétiques définitive. (Sturgeon et al. 2014)

- **La conversion directe** : La conversion directe correspond à l'utilisation de facteurs de transcription pour reprogrammer directement des cellules en progéniteurs hématopoïétiques. La première étude à induire directement des progéniteurs hématopoïétiques primitifs a réussi cette exploit en fusionnant des fibroblastes embryonnaires avec des cellules CD34⁺ de foie fœtal (Sandler, Lailier, and Bouhassira 2011). Par la suite, de nombreuses équipes ont identifié et transfecté des facteurs de transcription dans des fibroblastes pour générer des progéniteurs hématopoïétiques définitifs. ayant une faible capacité de prise de greffe (Szabo et al. 2010; Mitchell et al. 2014; Pulecio et al. 2014; Pereira et al. 2013). La génération de CSH est dynamique et passe par une transition endothélio-hématopoïétique tout comme la naissance des première *bone fide* CSH. Elcheva et al. ont établi que deux groupes de facteurs de transcription pouvaient générer des cellules hématopoïétiques à partir d'iPSC humaines : *ETS variant 2* (ETV2) et *GATA binding protein 2* (GATA2) dirigent les cellules transduites vers un programme pan-myéloïde alors que GATA2 et *TAL bHLH transcription factor 1* (TAL1) dirigent les cellules transduites vers un progéniteur érythro-mégacaryocytaire encore une fois grâce à une transition endothélio-hématopoïétique (Elcheva et al. 2014). Une étude de l'équipe de Shahin Raffi a montré qu'il était possible d'obtenir des CSH très proche des *bona fide* CSH humaines à l'aide de la transfection de seulement 4 facteurs de transcription (*FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog B* (FOSB), *Growth Factor Independent 1 Transcriptional Repressor* (GFI1), *Runt Related Transcription Factor 1* (RUNX1) et SPI1 , [ci-après nommé « FGRS »]) dans des cellules de veines ombilicales humaines (HUVECs) co-cultiver avec des HUVEC-E4ORF1, connues pour augmenter la capacité d'autorenouveau et de différenciation des CSH grâce à la production de *Notch ligands*, de *Kit ligands*, de BMPs et de Wnts (Kobayashi et al. 2010). Ces CSH-FGRS sont capables de greffer dans des souris immunodéficientes après une première et une seconde transplantation ainsi que de produire des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes de long-termes. Cependant, ces CSH ne produisent que très peu de lymphocytes T matures, se distinguant ainsi des *bona fide* CSH (Sandler et al. 2014). Une autre étude récente de cette même équipe a réussi à obtenir dans CSH-FGRS murines comparables aux *bona fide* CSH murines en n'exprimant que transitoirement les 4 facteurs de transcription. Ainsi ces CSH-FGRS sont capables de greffer dans des souris immunodéficientes après une greffe primaire et secondaire, de produire des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes mais



aussi de produire des lymphocytes T matures immunocompétents capables d'engager une réponse immunitaire adaptative (Lis et al. 2017);

- **La stratégie hybride** : Comme décrit précédemment, il est possible d'obtenir des progéniteurs hématopoïétiques de deux façons : d'une manière antérograde à l'aide de la différenciation dirigée ou d'une conversion direct d'une cellule en une cellule progénitrice hématopoïétique. Développée par l'équipe de George Daley, la stratégie hybride propose de combiner l'approche antérograde avec une approche rétrograde afin d'exploiter les atouts des deux méthodes. Ainsi en 2012, l'équipe de Daley émet l'hypothèse qu'il est préférable de reprogrammer des cellules progénitrices hématopoïétiques issues des iPSC, plus proche épigénétiquement des CSH que les fibroblastes ou les cellules endothéliales, pour obtenir des CSH capables de greffer et de rétablir l'hématopoïèse dans des souris immunodéprimées. L'équipe de Daley différencie des iPSC en cellules progénitrices hématopoïétiques exprimant les marqueurs CD45⁺ CD34⁺ et les transfecte avec 5 facteurs de transcriptions HOX9, ERG, RORA, SOX4 et MYB générant ainsi des CSH permettant une greffe primaire de court-terme sans lymphopoïèse (Doulatov et al. 2013). En 2017, l'équipe de Daley réalise une nouvelle prouesse. Ils différencient cette fois-ci des iPSC en cellules endothéliales, pour ensuite les transfecter avec 7 facteurs de transcription [ERG, HOXA5, HOXA9, HOXA10, LCOR, RUNX1 et SPI1, (ci-après nommé 7TFs)]. Avec cette méthode ils réussissent à obtenir des CSH-7TF proche des *bona fide* CSH. En effet, ces CSH-7TF greffent de manière robuste et produisent des lymphocytes T matures fonctionnelles contrairement à l'étude de 2012 (Sugimura et al. 2017).

Pour notre étude nous utiliserons un système de différenciation dirigée en deux dimensions sans cellules stromales pour la production des progéniteurs hématopoïétiques (exprimant les marqueurs CD43 et CD34). Ce système de différenciation a été développé par Mills et al. en 2014 et permet de différencier les iPSC en cellules progénitrices correspondant à la première vague hématopoïétique (hématopoïèse primitive) retrouvée au cours de l'embryogénèse. Ce protocole présente plusieurs avantages : l'utilisation de milieux définis (figure 27), l'absence de cellules stromales et la libération des progéniteurs hématopoïétiques de la couche stromale réduisant le nombre d'étape de tri cellulaire (figure 28) (J. A. Mills et al. 2014).

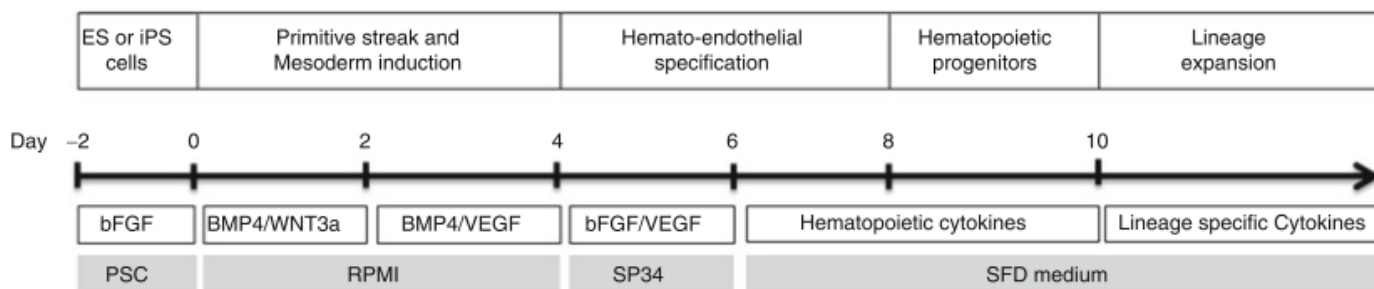


Figure 27 : Représentation schématique du protocole « monocouche de cellules adhérentes ».

Représentation schématique du protocole « monocouche de cellules adhérentes » montrant les différents milieux et cytokines utilisés pour l'émergence de cellules différenciées. (J. A. Mills et al. 2014) (numéro de licence : 4198940076516).

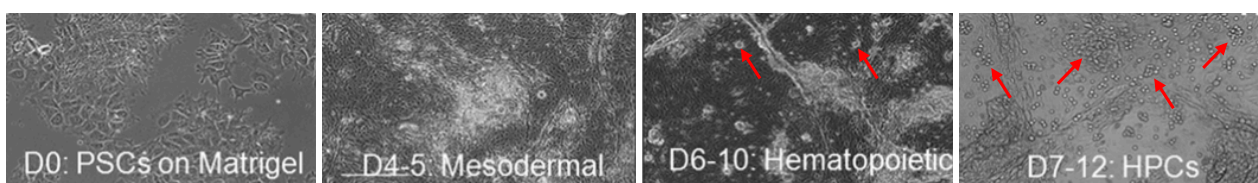


Figure 28 : Photos à différents jours de la différenciation des cellules pluripotentes induites selon le protocole « monocouche de cellules adhérentes ».

D0 : Cellules souches pluripotentes indifférenciées sur une couche de matrigel, D4-5 : formation d'une monocouche de cellules mésodermiques, D6-10 : apparition des premières cellules hématopoïétiques sur la monocouche de cellules endothéliales, D7-12 : les grappes de cellules progénitrices hématopoïétiques se détachent de la monocouche de cellules endothéliales. (J. A. Mills et al. 2014) (numéro de licence : 4198940076516).

III. 2. Modélisation des hémopathies myéloïdes

Les iPSC ont d'abord été générées à partir de lignées cellulaires immortalisées (Carette et al. 2010; Utikal et al. 2009; Miyoshi et al. 2010; X. Zhang et al. 2013; Stricker et al. 2013; Corominas-Faja et al. 2013), démontrant que le processus de reprogrammation était possible, même dans des cellules cancéreuses, ouvrant ainsi la voie à la reprogrammation de cellules primaires issues de patients. Jusqu'à présent, les iPSC dérivées de cellules malignes ou pré-malignes ont été générées majoritairement à partir de néoplasmes myéloprolifératifs tels que LMC, PV et MFP. Seulement trois lignées iPS ont été générées à partir de SMD [RA, RAEB, del(7)q]. Quant aux SMD/SMP, deux lignées iPS ont été générées à partir de cellules de patients atteints de JMML (K. Hu et al. 2011; Gandre-Babbe et al. 2013; Hosoi et al. 2014; Kotini et al. 2015; Ye et al. 2009; Ye et al. 2014; Mulero-Navarro et al. 2015). Les iPSC dérivées de ces pathologies récapitulent les caractéristiques de ces pathologies sur le plan moléculaire et phénotypique : défauts du potentiel de différenciation, de la formation de colonies en méthylcellulose, de la prolifération, de la viabilité et de l'expression de gènes.

L'une des raisons pour lesquelles il y a peu de lignées iPS dérivées de cellules primaires de patients est que les cellules cancéreuses sont plus difficiles à reprogrammer (Kotini et al. 2015). Cette difficulté dépend du type de cancer car de nombreuses lignées iPS ont été générées à partir

des SMP (K. Hu et al. 2011; Gandre-Babbe et al. 2013; Hosoi et al. 2014; Ye et al. 2009; Ye et al. 2014; Mulero-Navarro et al. 2015) et très peu à partir de SMD ou de SMD/SMP (Gandre-Babbe et al. 2013; Kotini et al. 2017; Chao et al. 2017). Une étude récente étude montre qu'il n'a été possible de reprogrammer que 4 sur 8 échantillons de patients atteints d'un SMD. Les échantillons possédant une del(5)q et une monosomie 7, qui sont deux anomalies fréquemment retrouvées dans les SMD, n'ont pas pu être reprogrammées (Kotini et al., 2017).

Théoriquement, les iPSCs sont un très bon modèle pour les études mécanistiques et sont une source inépuisable de matériel cellulaire. Elles devraient permettre de comprendre les mécanismes de la tumorigenèse et d'étudier la réponse aux traitements (figure 29a). Il est possible d'introduire des modifications génétiques stables à l'aide d'outils moléculaires comme le système CRISPR-Cas9 (Hockemeyer and Jaenisch 2016) : des mutations spécifiques peuvent être insérées dans des iPSC normales ou des iPSC dérivées de cellules cancéreuses (figure 29b). Le système CRISPR-Cas9 permet de perturber l'expression des gènes par l'introduction d'un décalage du cadre de lecture dans les régions codantes en utilisant le processus de NHEJ (*nonhomologous end-joining*) ou d'introduire une mutation spécifique en utilisant le processus HDR (*homology-directed repair*) (Sterneckert, Reinhardt, and Schöler 2014; Cox, Platt, and Zhang 2015). La technologie CRISPR-Cas9 peut être utilisée pour introduire des lésions génétiques de plus grande taille, souvent détectées dans les cellules cancéreuses, comme la délétion, l'inversion, ou la translocation d'un chromosome ou d'un fragment de chromosome (Kotini et al. 2015; Maddalo et al. 2014). La reprogrammation clonale capture des clones distincts correspondant à différentes étapes de l'évolution cancéreuse (Kotini et al. 2017; Kotini et al. 2015) (Figure 29c). Pour finir, les iPSCs peuvent aussi être utilisées pour capter l'hétérogénéité génétique d'une tumeur et distinguer les altérations génétiques intervenant à l'étape pré-cancéreuse et celles induisant la transformation (figure 29d).

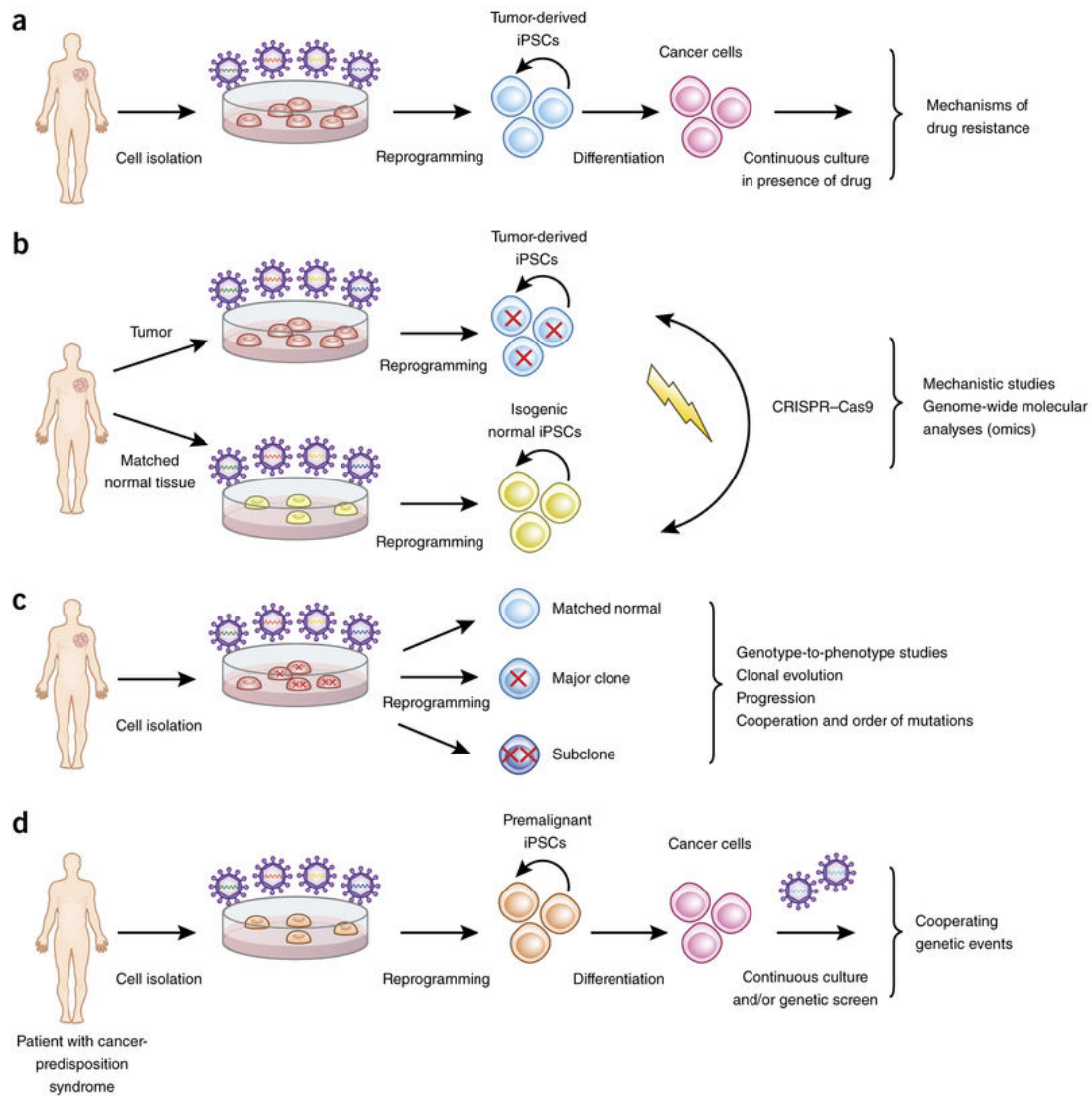


Figure 29 : L'utilisation potentielle des iPSCs dans la recherche sur le cancer.

a) Les iPSCs dérivées de cellules cancéreuses traitées avec un médicament pendant un temps prolongé pourrait servir à étudier les mécanismes de résistance aux médicaments. b) Les iPSCs dérivées de cellules cancéreuses et des iPSCs dérivées de cellules normales isogéniques couplées à l'utilisation de technique de modification du génome permettent d'étudier les effets cellulaires et moléculaires de mutations spécifiques. c) Les iPSCs permettent de capturer l'hétérogénéité clonale et les différentes étapes de l'évolution d'un clone malin. d) Les iPSCs dérivées de cellules précancéreuses permettent d'étudier les mécanismes de coopération entre certaines mutations. (Papapetrou 2016) (numéro de licence : 4202000975209).

III. 3. Laplane L., Beke A., Vainchenker W. et Solary E., *Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells as New Model Systems in Oncology, Stem Cells, 2015*



EMBRYONIC STEM CELLS/INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells as New Model Systems in Oncology

LUCIE LAPLANE,^{a,b,c,d} ALLAN BEKE,^{a,b,c} WILLIAM VAINCHENKER,^{a,b,c} ERIC SOLARY^{a,b,c}

Key Words. Induced pluripotent stem cells • Cancer • Genetic predisposition • Clonal evolution

^aGustave Roussy Cancer Center, Villejuif, Paris, France; ^bINSERM, UMR1170, Villejuif, Paris, France; ^cUniversité Paris-Sud, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, Paris, France; ^dUniversité Paris I-Panthéon Sorbonne, Institut d'Histoire et de Philosophie des Sciences et des Techniques, Paris, France

Correspondence: Lucie Laplane, Ph.D., Inserm U1170, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, Paris, France. Telephone: +33-1-42-11-44-78; e-mail: lucie.laplane@gustaveroussy.fr

Received March 20, 2015; accepted for publication May 31, 2015; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* July 14, 2015; available online without subscription through the open access option.

© AlphaMed Press
1066-5099/2014/\$30.00/0

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.2099>

ABSTRACT

The demonstration that pluripotent stem cells could be generated by somatic cell reprogramming led to wonder if these so-called induced pluripotent stem (iPS) cells would extend our investigation capabilities in the cancer research field. The first iPS cells derived from cancer cells have now revealed the benefits and potential pitfalls of this new model. iPS cells appear to be an innovative approach to decipher the steps of cell transformation as well as to screen the activity and toxicity of anticancer drugs. A better understanding of the impact of reprogramming on cancer cell-specific features as well as improvements in culture conditions to integrate the role of the microenvironment in their behavior may strengthen the epistemic interest of iPS cells as model systems in oncology. *STEM CELLS* 2015;33:2887–2892

SIGNIFICANCE STATEMENT

The ability to reprogram any type of differentiated cell into a pluripotent cell, the so-called induced pluripotent stem (iPS) cells, has opened new perspectives in cancer research. This review discusses the already tested opportunities that using cancer cell-derived iPS clones has created and proposes additional applications, especially when other models have failed. More specifically, we discuss the possibility to capture various stages of the disease, including pre-malignant steps and disease predisposition, and to model cancer stem cells. iPS cells could be also appropriate models to test the activity of drugs and to detect some toxic effects.

INTRODUCTION

The limits inherent to every model used in cancer research restrict the scope of potential investigations. Induced pluripotent stem (iPS) cells, which are pluripotent stem cells generated by inducing somatic cell dedifferentiation, have recently been tested as new models in cancer research. We are just at the beginning of understanding how this model could extend our investigation capabilities in the cancer field.

The technology allowing the generation of iPS cells was first established by Kazutoshi Takahashi and Shinya Yamanaka in mouse fibroblasts [1], and was subsequently applied to human cells [2]. Dedifferentiation and reprogramming were made possible by expressing in differentiated cells, four transcription factors that are usually expressed in pluripotent embryonic stem cells (ESCs), namely Oct-4, Sox2, Klf4, and C-Myc. Following retrovirus-mediated transduction of the genes encoding these four transcription factors, some fibroblasts in culture switched to a pluripotent undifferentiated state. By escaping the

fierce of controversy provoked by the use of human ESC, the ability to generate iPS cells was considered as a breakthrough offering new potential opportunities for regenerative medicine, genetic disorder modeling, drug discovery, and drug safety testing.

Since 2009, the reprogramming technology has been successfully applied to cancer cells. Cancer iPS clones were generated from melanoma, chronic myeloid leukemia (CML), gastrointestinal carcinoma, squamous cell carcinoma, and several other cancer-derived cell lines. iPS clones were also obtained by reprogramming CML, juvenile myelomonocytic leukemia, myeloproliferative neoplasm, prostate cancer, and pancreatic ductal adenocarcinoma primary cells. These studies provided the proof of principle that cancer cell-derived iPS clones may be useful models for oncology research.

THE DEMONSTRATED ADVANTAGE OF USING iPS CELLS AS CANCER MODELS

iPS clones provide unique information on the consequences of germline mutations that



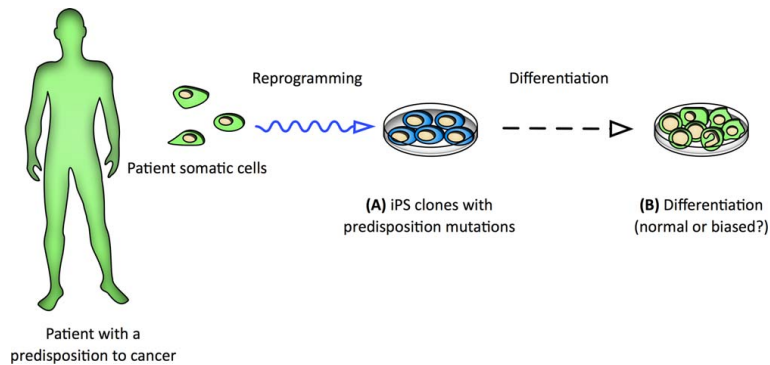


Figure 1. Generating iPS clones to study cancer predisposition. Adult somatic cells from patients carrying a genetic predisposition can be reprogrammed into iPS cells. A phenotype will be observed at the iPS cells stage (e.g., abnormal proliferation rate and accumulation of genomic damages) (A) or after inducing iPS cells in vitro differentiation into specialized cells (B). Abbreviation: iPS, induced pluripotent stem.

predispose to malignancies (Fig. 1). For example, FPD/AML (familial platelet disorder with a predisposition to acute myeloid leukemia) is an autosomal dominant disease caused by germline heterozygous mutations in *RUNX1* gene. The attempts to create FPD/AML animal models have been disappointing. Heterozygous *Runx1* mutation leading to haploinsufficiency does not induce any disease. The complete knockout of *Runx1* gene in mice is embryonic lethal whereas knockout induced in adult animals generates a thrombocytopenia and, in some cases, a myeloid malignancy. iPS clones have been generated from FPD patient cells. These clones display the defect in megakaryocytic differentiation that characterizes FPD and the correction of *RUNX1* mutation in these clones, through either gene editing [3], or overexpression of wild-type *RUNX1* [4], normalizes megakaryopoiesis. These results enforce the demonstration that *RUNX1* mutations and *RUNX1* dosage are responsible for the defect in megakaryopoiesis observed in FPD. Analysis of FPD/AML iPS clones demonstrated also, and for the first time, the crucial role of *RUNX1* in regulating the first wave of human primitive hematopoiesis [5]. This predisposition to leukemia appeared to involve an increased proliferation of myeloid progenitors and a genomic instability, which were inversely related to *RUNX1* expression level. The interest of iPS clones to explore the consequences of transcription factor gene dosage was recently validated in other settings [6].

FPD/AML-derived iPS clones are now used in an attempt to decipher initial steps of transformation. The proof-of-concept that iPS clones could be helpful to identify the initial steps of cell transformation has been obtained using iPS cells derived from patients with a Fanconi anemia, another genetic disease that predisposes to malignancies and cannot be fully recapitulated in mice [7]. Fanconi anemia-derived iPS cells demonstrate defects in their ability to generate hematopoietic, mesenchymal, and neural cells. Methylation changes were identified in the generated neural stem cells, leading to the deregulation of tumor-promoting and tumor-suppressor gene expression. Such deregulation may account for the formation of medulloblastomas [8].

Constitutive trisomy 21 (T21) also affects diverse tissues including the hematopoietic tissue. Approximately 10% of T21

newborns exhibit a clonal preleukemia, referred to as a transient myeloproliferative disease, which is always associated with an acquired mutation in *GATA-1* exon 2 leading to a short form of this transcription factor (GATA-1s). This transient situation evolves into acute megakaryoblastic leukemia in 30% of cases through acquisition of additional mutations. The impact of an additional chromosome 21 on embryonic and fetal hematopoiesis is difficult to determine in animal models. Interestingly, differentiation of iPS clones generated from T21 patients demonstrated the abnormal differentiation of iPS-derived blood progenitors [9], providing models for further mechanistic analyses. This approach, together with fetal liver analyses, demonstrated that trisomy 21 alters fetal but not adult hematopoiesis. Accordingly, the transient myeloproliferative disease observed in some T21 newborns disappears a few months after birth when hematopoiesis switches from the fetal liver to the bone marrow.

Finally, iPS clones were established from patients carrying a constitutive mutation in *BRCA1* or *BRCA2* tumor-suppressor genes. *BRCA1* and *BRCA2* are key players in DNA repair, gene transcription, cell-cycle regulation, polyadenylation of messenger RNA, and ubiquitinylation. Mice have been genetically engineered to model *BRCA1* and *BRCA2* deficiencies. These animal models demonstrated some limits, for example, mutation in a single *BRCA1* allele leads to genomic instability in human cells but not in mouse cells [10]. Analysis of iPS clones derived from patients carrying a *BRCA1* mutation provided new insights in their biological effects, such as the identification of an increase in the expression level and activity of protein kinase-C-theta. Interestingly, the reprogramming-associated de novo mutation rate was not higher in *BRCA1* mutants than in control iPS cells. These clones were used to screen therapeutic compounds that could prevent the development of tumors in genetically predisposed patients [11].

Cancer-derived iPS clones have also been used to model early stages of cancers in the absence of identified predisposition. Generation of cancer cell lines as well as serial transplantation of cancer cells in the mouse usually require features that are characteristic of the most aggressive cancer types, such as a high proliferative index of disease

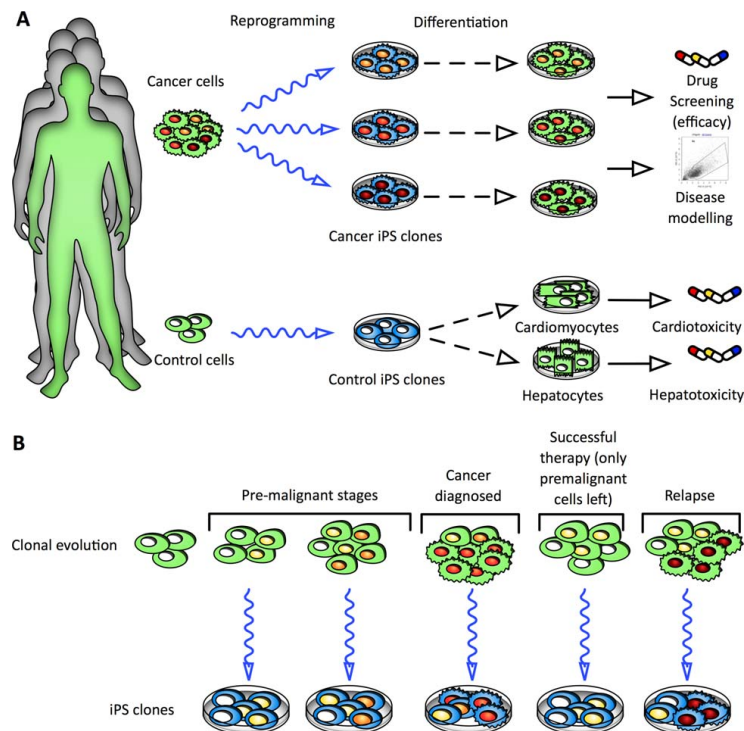


Figure 2. Generating iPS clones to study drug efficacy and toxicity, and cancer progression. **(A):** iPS clones with different genetic background could be established from a tumor sample and used to explore the heterogeneity of tumor cell biology and sensitivity to drugs. iPS clones generated from normal cells (control) of the same patient will be differentiated into specialized cell types to detect tissue-specific toxicities of the studied drugs. **(B):** iPS clones could be used to model and explore various stages of disease progression, including premalignant stages, malignant stages, therapeutic response, and relapse. Abbreviation: iPS, induced pluripotent stem.

propagating cells. Modeling of early phases of cancer progression is a much more difficult task. iPS clones could be derived from cancer cells at any stage, including the earliest. For example, a pluripotent iPS cell lines established by reprogramming human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells were observed to generate pancreatic intraepithelial neoplasia precursors to PDAC when injected to immunocompromised mice. The generated tumor subsequently progressed to an invasive stage [12]. This observation suggested that iPS cell generation could be used to identify early stages of cancers, providing new insights into disease progression mechanisms.

Last but not least, cancer-derived iPS clones were used to explore the tumor cell response to anticancer drugs (Fig. 2A). An exciting observation was made in iPS clones established from CML [13–15]: the *BCR-ABL* fusion gene, which is a molecular signature of CML, encodes a tyrosine kinase whose chemical inhibition with tyrosine kinase inhibitors (TKI), such as Imatinib, has dramatically improved the disease outcome. It was established however that TKI do not eradicate CML stem cells. Interestingly, iPS cells derived from patients responding to Imatinib are resistant to the drug, and inducing their differentiation into hematopoietic progenitors restores their sensitivity. Thus, iPS cells recapitulate a characteristic feature of the

disease, providing a model to explore the mechanisms by which leukemia propagating cells resist to TKI. Another disease in which malignant cell-derived iPS clones were tested for their ability to model the diseased cell response to various drugs is juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), an aggressive myeloproliferative neoplasm/myelodysplastic syndrome in which myeloid progenitors are hypersensitive to the granulocyte colony-stimulating factor. This characteristic feature was conserved in hematopoietic cells generated by differentiation of JMML-derived iPS cells, allowing to examine the activity of kinase inhibitors on these differentiated cells [16]. We and others used a similar approach to explore the activity of Janus-activated kinase 2 (JAK2), phosphatidylinositol-3-kinase, and Heat Shock Protein 90 inhibitors on hematopoietic cells generated by inducing the differentiation of *JAK2^{V617F}* myeloproliferative neoplasm-derived iPS cells [17, 18].

Altogether, these models illustrate the ability of cancer-derived iPS cells to model differentiation bias induced by genetic alterations that predispose or contribute to cell transformation and to explore cancer cell response to various anticancer drugs. Their interest may further increase with the development of gene editing techniques, allowing manipulation of these cellular models.

THE POTENTIAL BENEFITS OF iPS CELLS FOR FUTURE RESEARCH

A first issue will be to determine whether cancer-derived iPS cells could bring an input to the cancer stem cell (CSC) controversy. CSCs were proposed to be the driving force of cancer development and progression, and the cause of some therapeutic failures [19, 20]. As they often represent a tiny fraction of cancer cells, the possibility to generate a great number of them using iPS technology would be of great interest [21]. However, the existence and the role of CSCs remain controversial issues. First, some cancers may not be hierarchically organized [22], and the challenge to model CSCs from iPS clones in these cancers has limited relevance. Second, in hierarchically organized tumors, some cancer non-stem cells could dedifferentiate and acquire the properties of CSCs [23, 24]. In these latter cases, iPS cells may be useful to explore the dedifferentiation of somatic cells following an oncogenic insult [25, 26]. More generally, it might be informative to identify the features that allow a minor fraction of transduced cells to achieve reprogramming.

The challenge will be to determine the right stage of iPS cell differentiation that reproduces CSC features. The fact that, before any induction of differentiation, CML-derived iPS clones resist to imatinib similarly to CML propagating cells [14, 15] does not mean that they are CML stem cells, nor that they resist through mechanisms that are similar to those developed by primary leukemic stem cells. By reprogramming a mammary epithelial cell line into iPS cells, then inducing their differentiation, Nishi et al. obtained so-called CSC-like cells that were used to screen compounds that selectively target CSCs such as salinomycin [27] and withaferin [28]. Several other studies claimed they had reprogrammed tumor cells [21, 29] and even normal cells [30] into CSC-like cells. While all these studies remain insufficient to demonstrate the ability to truly model CSCs, the research topic seems worthwhile to be explored. If the generation and subsequent differentiation of cancer iPS clones established from cancer cells can model the disease, then one can legitimately expect that iPS clones also model, and expand, the CSCs.

Another field in which iPS cell technology may open avenues is the analysis of biological steps that forerun the clinical development of cancers (Fig. 2). In these recently described premalignant clones, somatic mutations in one or several genes increase the rates of cancer development. For example, some monozygous twins were observed to develop an acute leukemia from a common preleukemic clone established in utero [31]. Mel Greaves has recently proposed that, given the rate of spontaneous mutations, the rate of cell divisions, and our life duration, we may all grow premalignant cells [32]. Increasing evidence indicate that hematopoiesis can become clonal with ageing, in the absence of any overt disease [33–36]. There is evidence that hematopoietic stem cells lose a part of their capacities during aging, due to both intrinsic and extrinsic changes. For example, mutations affecting *TET2* and *DNMT3A* genes could increase stem cell fitness while being the ground for additional oncogenic mutations leading to malignancies [37, 38]. Importantly, these preleukemic (initiating) clones could resist to treatment and regenerate malignant clones over time through occurrence of new mutations [39].

Since all the clones do not evolve into a malignant disease, the challenge is to identify and to target premalignant

lesions with great propensity to evolve further into life-threatening cancers. We lack models to study the biological properties of premalignant clones and how the mutated cell ultimately transforms into a malignant one. Due to their relatively short life span, mouse models are poorly appropriate for studying predisposition to cancer, and it is likely that it will be the same to explore stepwise progression to malignancy. Cell lines are generated from fully malignant cells, not from premalignant stages. Therefore, establishing iPS clones from premalignant cells that accumulate with age might offer an unprecedented opportunity to explore their biological features and to better identify the steps that precede cancer-initiating events (Fig. 2B), that is, these models may distinguish the consequences of increased proliferation from those of genetic instability and replicative stress.

We have shown that cancer-derived iPS clones could be used to screen anticancer drugs. The causes of failure in the development of an anticancer drug, either lack of efficacy or toxicity to healthy tissues, have to be identified as early as possible [40]. In addition to being a potential alternative to animal models, cancer-derived iPS cells could be closer to clinical situations than many other cancer models as they capture the complex genetic background of patient tumors. These “diseases-in-a-dish” may be used early in the preclinical drug development process [41]. Importantly, cancer cell reprogramming could capture a part of tumor heterogeneity, underlining the interest of testing several independent clones generated from a same tumor. When needed, RNA interference technology and gene editing can reproduce genetic alterations that have not been captured by tumor cell reprogramming. Then, the limitless expansion of cancer iPS cells allows to simultaneously test multiple compounds at multiple time points, and to compare cancer-derived iPS cells to iPS cells derived from normal cells with the same genetic background. Finally, high throughput screens could compare cancer cell-derived iPS clones established from a number of patients to determine whether a drug efficacy depends on the tumor cell genetic background, the results of these screens being used to guide the development of precision medicine [42, 43].

As their differentiation into specific cell types provides opportunities to screen the toxic effects of the drugs on normal tissues, iPS clones established from healthy donor cells will also facilitate anticancer drug development. For example, cardiomyocytes obtained by differentiation of iPS cells, which faithfully recapitulate adult human ventricular cardiomyocyte properties, could be used to anticipate increase in QT interval arrhythmias, and other cardiac side effects of a developed drug [44]. Human iPS cells can also be differentiated into functional hepatocytes that are promising tools to screen for drug hepatotoxicity [45] (Fig. 2A). Early detection of a toxic effect may limit the cost of drug development and provide opportunities to modify chemically the candidate drug in order to suppress its toxic effects without eliminating its therapeutic properties.

HOW TO IMPROVE THE EPISTEMIC INTEREST OF CANCER-DERIVED iPS CLONES?

As every other cancer model, cancer iPS clones have intrinsic limitations inherent to the model. The first one is that probably all the tumor cells cannot be reprogrammed. For

example, TET2 is a 5-methylcytosine dioxygenase that could be involved in complete reprogramming [46]. Homozygous loss of function mutations in *TET2* gene, which are frequently observed in hematopoietic malignancies, is therefore suspected to prevent leukemic cell reprogramming.

The second limitation is that cancer cell reprogramming may alter their epigenetic landscape. These modifications could potentially eliminate some of the characteristic features of the cancer cell phenotype, creating a distance between the cancer iPS model and the original cancer cell. According to this hypothesis, it was even proposed that reprogramming could be used therapeutically to revert the cancer phenotype [47, 48], although it will not eliminate the gene mutations that characterize the transformed cells. iPS cell technology also faces some extrinsic limitations that may be overcome by improving the culture conditions used to maintain or expand cancer iPS clones, to induce their differentiation, and to explore their ability to generate tumors in immune-compromised animals. For example, using endothelial cells that overexpress Notch ligands jagged-1 and delta-like ligand-4 improves the formation of hematopoietic multipotent progenitor from pluripotent stem cells and markedly increases the engraftment of the iPS cells in NOD/SCID/IL-2 receptor γ chain-null mice [49].

Last but not least, as physiologically integrated and functionally autonomous entities maintained in culture, cancer iPS clones fail to model the role of the cancer cell interactions with surrounding tissues in their development. Improvements of in vitro culture conditions to partially model the tumor cell

environment would strengthen the epistemic interest of cancer iPS cells. For example, iPS cells could be used to form organoids [50] and organ-on-a-chip, which are a multichannel three-dimensional microfluidic cell culture chip aiming at mimicking entire organs such as lung, heart, kidney, artery, or gut, which are presented as “promising substitutes for animal testing” [51]. However, organ-on-a-chip is not patient-on-a-chip. Cancer iPS cells cannot answer all the questions raised by tumor arising, development, and response to therapy, neither can any other model, but they may provide some new clues that no other model offers.

ACKNOWLEDGMENTS

E.S. team is supported by grants from the French National Cancer Institute and labeled by the Ligue Nationale Contre le Cancer. W.V. team is labeled by the Ligue Nationale contre le Cancer. L.L. is supported by SOCRATE program, and platforms are supported by Molecular Medicine in Oncology (MMO) and Paris Alliance for Cancer Research Initiative (PACRI) programs.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors equally contributed to the manuscript.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663–676.
- 2 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861–872.
- 3 Connelly JP, Kwon EM, Gao Y et al. Targeted correction of runx1 mutation in fpd patient-specific induced pluripotent stem cells rescues megakaryopoietic defects. *Blood* 2014;124:1926–1930.
- 4 Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N et al. Impaired hematopoietic differentiation of runx1-mutated induced pluripotent stem cells derived from fpd/aml patients. *Leukemia* 2014;28:2344–2354.
- 5 Antony-Debré I, Manchev VT, Balayn N et al. Level of runx1 activity is critical for leukemic predisposition but not for thrombocytopenia. *Blood* 2015;125:930–940.
- 6 Adamo A, Atashpaz S, Germain PL et al. 7q11.23 dosage-dependent dysregulation in human pluripotent stem cells affects transcriptional programs in disease-relevant lineages. *Nat Genet* 2015;47:132–141.
- 7 Parmar K, D'Andrea A, Niedernhofer LJ. Mouse models of fanconi anemia. *Mutat Res* 2009;668:133–140.
- 8 Liu GH, Suzuki K, Li M et al. Modelling fanconi anemia pathogenesis and therapeutics using integration-free patient-derived ipscs. *Nat Commun* 2014;5:4330.
- 9 Chou ST, Byrka-Bishop M, Tober JM et al. Trisomy 21-associated defects in human primitive hematopoiesis revealed through induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:17573–17578.
- 10 Konishi H, Mohseni M, Tamaki A et al. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene brca1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:17773–17778.
- 11 Soyombo AA, Wu Y, Kolski L et al. Analysis of induced pluripotent stem cells from a brca1 mutant family. *Stem Cell Reports* 2013;1:336–349.
- 12 Kim J, Hoffman John P, Alpaugh RK et al. An ipsc line from human pancreatic ductal adenocarcinoma undergoes early to invasive stages of pancreatic cancer progression. *Cell Reports* 2013;3:2088–2099.
- 13 Carette JE, Pruszk J, Varadarajan M et al. Generation of iPSCs from cultured human malignant cells. *Blood* 2010;115:4039–4042.
- 14 Kumano K, Arai S, Hosoi M et al. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood* 2012;119:6234–6242.
- 15 Bedel A, Pasquet JM, Lippert E et al. Variable behavior of ipscs derived from cml patients for response to tki and hematopoietic differentiation. *PLoS One* 2013;8:e71596.
- 16 Gandre-Babbe S, Paluru P, Aribéana C et al. Patient-derived induced pluripotent stem cells recapitulate hematopoietic abnormalities of juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 2013;121:4925–4929.
- 17 Saliba J, Hamidi S, Lenglet G et al. Heterozygous and homozygous jak2(v617f) states modeled by induced pluripotent stem cells from myeloproliferative neoplasm patients. *PLoS One* 2013;8:e74257.
- 18 Ye Z, Liu CF, Lanikova L et al. Differential sensitivity to jak inhibitory drugs by isogenic human erythroblasts and hematopoietic progenitors generated from patient-specific induced pluripotent stem cells. *STEM CELLS* 2014;32:269–278.
- 19 Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 2014;14:275–291.
- 20 Laplane L. Identifying some theories in developmental biology: The case of the cancer stem cell theory. In: Minelli A, Pradeu T, eds. *Toward a Theory of Development*. Oxford: Oxford University Press, 2014:246–259.
- 21 Oshima N, Yamada Y, Nagayama S et al. Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PLoS One* 2014;9:e101735.
- 22 Kelly PN, Dakic A, Adams JM et al. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* 2007;317:337.
- 23 Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ et al. The developing cancer stem-cell model: Clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol* 2012;13:e83–89.
- 24 Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem* 2013;59:168–179.
- 25 Menendez JA, Joven J, Cufi S et al. The Warburg effect version 2.0: Metabolic reprogramming of cancer stem cells. *Cell Cycle* 2013;12:1166–1179.



- 26 Friedmann-Morvinski D, Verma IM. Dedifferentiation and reprogramming: Origins of cancer stem cells. *EMBO Rep* 2014;15:244–253.
- 27 Nishi M, Sakai Y, Akutsu H et al. Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene* 2014;33:643–652.
- 28 Nishi M, Akutsu H, Kudoh A et al. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget* 2014;5:8665–8680.
- 29 Chen L, Kasai T, Li Y et al. A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2012;7:e33544.
- 30 Scaffidi P, Misteli T. In vitro generation of human cells with cancer stem cell properties. *Nat Cell Biol* 2011;13:1051–1061.
- 31 Hong D, Gupta R, Anciliff P et al. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* 2008;319:336–339.
- 32 Greaves M. Does everyone develop covert cancer? *Nat Rev Cancer* 2014;14:209–210.
- 33 Busque L, Patel JP, Figueroa ME et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet* 2012;44:1179–1181.
- 34 Welch JS, Ley TJ, Link DC et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 2012;150:264–278.
- 35 Shlush LI, Zandi S, Mitchell A et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 2014;506:328–333.
- 36 Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL et al. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:2548–2553.
- 37 Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 2014;371:2477–2487.
- 38 Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 2014;371:2488–2498.
- 39 Vasanthakumar A, Godley LA. On the origin of leukemic species. *Cell Stem Cell* 2014;14:421–422.
- 40 Hay M, Thomas DW, Craighead JL et al. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol* 2014;32:40–51.
- 41 Bellin M, Marchetto MC, Gage FH et al. Induced pluripotent stem cells: The new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:713–726.
- 42 Laurent LC, Nievergelt CM, Lynch C et al. Restricted ethnic diversity in human embryonic stem cell lines. *Nat Methods* 2010;7:6–7.
- 43 Matsa E, Rajamohan D, Dick E et al. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur Heart J* 2011;32:952–962.
- 44 Braam SR, Tertoolen L, Casini S et al. Repolarization reserve determines drug responses in human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res* 2013;10:48–56.
- 45 Sullivan GJ, Hay DC, Park IH et al. Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010;51:329–335.
- 46 Doege CA, Inoue K, Yamashita T et al. Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2. *Nature* 2012;488:652–655.
- 47 Zhang X, Cruz FD, Terry M et al. Terminal differentiation and loss of tumorigenicity of human cancers via pluripotency-based reprogramming. *Oncogene* 2013;32:2249–2260.
- 48 Miyoshi N, Ishii H, Nagai K et al. Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:40–45.
- 49 Gori JL, Butler JM, Chan YY et al. Vascular niche promotes hematopoietic multipotent progenitor formation from pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2015;125:1243–1254.
- 50 Xia Y, Sancho-Martinez I, Nivet E et al. The generation of kidney organoids by differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud progenitor-like cells. *Nat Protoc* 2014;9:2693–2704.
- 51 Luni C, Serena E, Elvassore N. Human-on-chip for therapy development and fundamental science. *Curr Opin Biotechnol* 2014;25:45–50.



III. 4. Lucie Laplane & Allan Beke., What Can We Learn From Stem Cells? Induced Pluripotent Stem Cells As models In Cancer, oral presentation, ISHPSSB Montréal, 2015

Abstract: Since the rise of the cell theory in the 19th century, the cell has been considered as a unit of structure, function, and reproduction. Cells are the elementary building block of life. Among cells, stem cells play a particular role and might be “units of development,” “units of regeneration,” and even “units in evolution” (Weissman 2000). What can we learn from those cells? And does stemness make stem cells a unit of particular interest for the explanation of some biological properties? In this presentation, we will focus on the case of induced pluripotent stem cells (iPSC) in oncology. It is now possible to generate pluripotent stem cells from patient cancer cells. Those cancerous iPSC then provide an unlimited resource of cancer cells to study and experiment with. The introduction of iPSC technology in oncology raises the question of whether and how it provides an adequate tool to model, experiment, understand, and cure cancers. We will first highlight the advantages and pitfalls of the introduction of iPSC as a new model in oncology, and then highlight the role of stemness in the ability of iPSC to model cancers.



IV. Objectifs

Il n'existe pas de bon modèle de leucémie myélomonocytaire chronique. Comme pour les autres hémopathies myéloïdes chroniques, il n'a jamais été possible d'établir une lignée cellulaire représentant la phase chronique de la maladie. Les modèles animaux sont très imparfaits, qu'il s'agisse des modèles de xénogreffe de cellules de patients chez la souris immunodéprimée (qui ne s'amplifient pas) ou de modèles génétiquement modifiés (qui ne reproduisent que certains aspects de la maladie).

Le premier objectif du projet qui m'a été confié était d'établir un modèle *in vitro* de la leucémie myélomonocytaire chronique en reprogrammant des cellules CD34⁺ de patients. Ces cellules ont été préférées aux cellules matures du clone leucémique comme les monocytes car les travaux antérieurs de l'équipe avaient montré la persistance d'une hétérogénéité clonale dans le compartiment CD34⁺, hétérogénéité perdue dans le compartiment mature du fait d'un avantage compétitif des cellules les plus mutées lors de la différenciation (Itzykson et al, Blood 2013). Ce premier objectif comportait aussi la mise au point d'un protocole de différenciation hématopoïétique des cellules reprogrammées afin de déterminer si les clones générés récapitulaient les principales caractéristiques de la maladie.

Le second objectif était d'introduire une altération génétique supplémentaire dans certains des clones établis, en l'occurrence la mutation SRSF2^{P95H}, absente dans les cellules utilisées pour la reprogrammation, afin de déterminer l'impact de cette mutation sur le phénotype cellulaire et de tester l'impact des médicaments sur les lignées établies en fonction des altérations génétiques identifiées.

La thèse que je défends à l'issue de ce travail est que 1) la reprogrammation de cellules CD34⁺ de patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique permet de capturer une partie de l'hétérogénéité moléculaire de la maladie ; 2) la différenciation hématopoïétique de ces clones iPSC reproduit les principales caractéristiques phénotypiques de la maladie ; 3) l'adjonction d'une mutation SRSF2^{P95H} dans ce contexte a un impact limité sur le phénotype ; 4) les agents déméthylants modifient les capacités de différenciation des cellules sans les éliminer.

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un article en préparation.



Chapitre II : *résultats*

Functional heterogeneity exceeds genetic heterogeneity in chronic myelomonocytic leukemia

Allan Beke,^{1,2} Julie Rivière,¹ Lucie Laplane,^{1,3} Miguel Torres-Martin,⁴ Véronique Saada,⁵ Ana Hurtado,⁶ Philippe Rameau,⁷ Larissa Lordier,¹ Cyriane Oeuvray,¹ Vincent Ribrag,⁸ William Vainchenker,¹ Maria Figueroa,⁴ Nathalie Droin,^{1,2} Éric Solary^{1,2,8}

1 – INSERM U1170, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, France

2 – Université Paris-Sud, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France

3 – CNRS UMR8590, IHPST, Université Paris 1 Panthéon-Sorbonne, Paris, France

4 – Human Genetics, University of Miami Miller School of Medicine

5 – Department of biopathology, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, France;

6 – Hematology and Medical Oncology Department, Hospital Morales Meseguer, IMIB, Murcia, Spain

7 – Department of Hematology, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, France

Correspondence to

Éric Solary

Gustave Roussy Cancer Center,

114 rue Edouard Vaillant

94805 Villejuif, France

Phone: 33 1 42 11 51 58

Fax: 33 1 42 11 52 40

email: eric.solary@gustaveroussy.fr

Key words: Clonal heterogeneity, myeloid leukemia, Chronic myelomonocytic leukemia, induced pluripotent stem cells, SRSF2 mutation,

Acknowledgments: This work was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (équipe labellisée), Institut National du Cancer (PRT-K), Fondation ARC (to Allan Beke thesis) and the Molecular Medicine in Oncology program (Agence Nationale de la Recherche).



Abstract

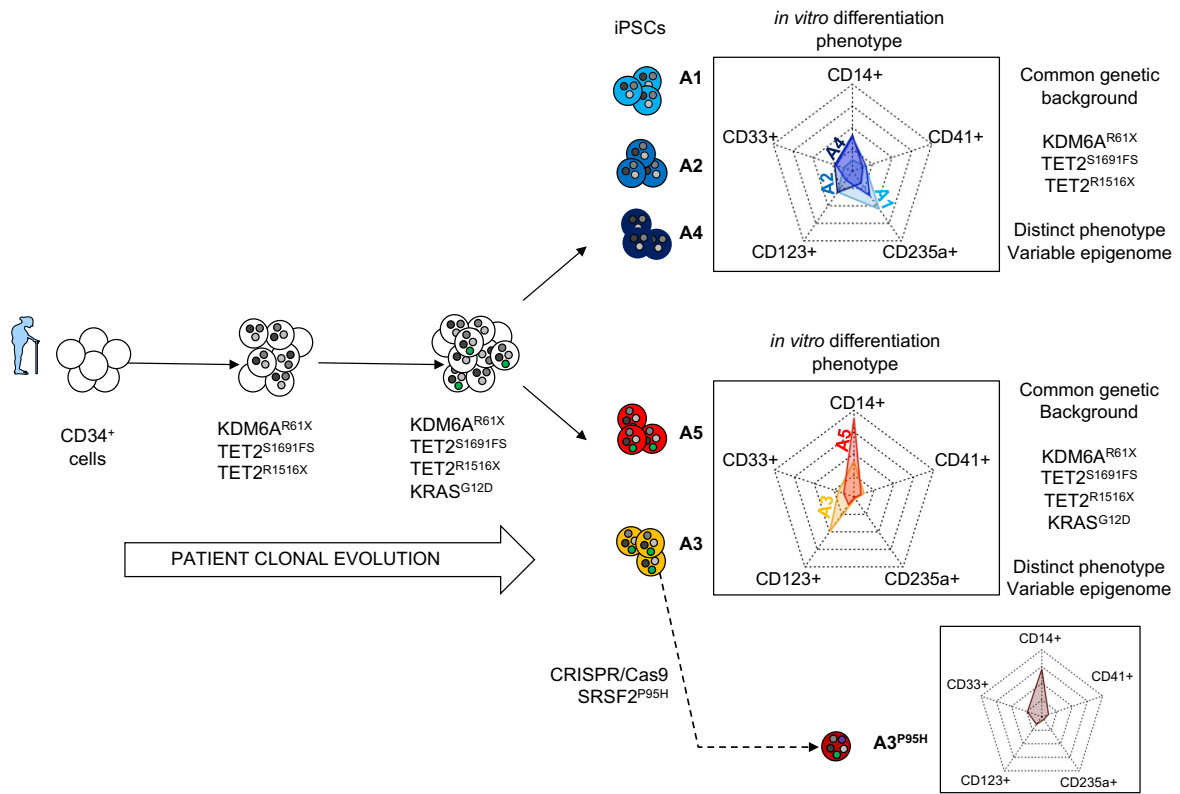
The respective role of genetic and epigenetic heterogeneity in the functional diversity of cells that compose human malignancies remains poorly understood. This question is addressed in chronic myelomonocytic leukemia (CMML), a myeloid neoplasm in which clinical diversity contrasts with a limited genetic heterogeneity. By reprogramming CMML-patient and healthy donor CD34-positive cells, we generated induced pluripotent cell clones (iPSC). In one of the patients, we captured a part of the genetic heterogeneity of the leukemic clone and analyzed five iPSC with two distinct genetic backgrounds, *i.e.* with and without $KRAS^{G12D}$ mutation. Hematopoietic differentiation of these clones recapitulated the main features of the patient disease, including overproduction of granulomonocytes and dysmegakaryopoiesis. These analyses also disclosed significant discrepancies in the behavior as well as the DNA methylation pattern and gene expression profile of hematopoietic cells derived from iPSCs with similar genetic background. Introduction of $SRSF2^{P95H}$ mutation in a $KRAS$ -mutated iPSC partially suppressed the functional and epigenetic gap with the other $KRAS$ -mutated clone. Finally, the demethylating agent decitabine had limited cytotoxic effect but restored a more balanced production of hematopoietic cells by genetically abnormal cells. These analyses unravel additional levels of intraclonal heterogeneity beyond genetic discrepancies, which may modulate individual cell response to treatment.

Highlights

- Reprogramming of chronic myelomonocytic leukemia (CMML) CD34⁺ cells captures a part of the intraclonal genetic heterogeneity of the disease.
- Hematopoietic differentiation of CMML-derived induced pluripotent cell clones (iPSC) recapitulates the main features of the patient disease.
- Patient-derived iPSC demonstrate additional levels of clonal heterogeneity, including epigenetic and functional heterogeneity
- Hypomethylating drugs diversely improve the hematopoietic differentiation of patient iPSC without killing these cells



Graphical abstract



Introduction

Intratumoral genetic heterogeneity is a major tenet of cancer biology. A tumor clone emerges from a single cell that has acquired one or several somatic mutations. Additional driver events that occur in individual daughter cells generate tumor subclones, each of them being endowed with specific functional properties and fitness (Landau et al. 2013; Klco et al. 2014; Chesnais et al. 2016; da Silva-Coelho et al. 2017). The order in which somatic events accumulate influences the clinical outcome (Ortmann et al. 2015), and evolutionary constraints modulate the order in which driver events are acquired (Swanton 2015). Epigenetic variation contributes to the functional heterogeneity of cells that form a tumor clone (S. Li et al. 2016; Landau et al. 2014). The links between genetic and epigenetic changes and how these abnormalities interact to generate functional heterogeneity among the cells that form a tumor clone remains only partly understood.

Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a neoplastic disease whose limited genetic heterogeneity contrasts with its clinical diversity, arguing for additional epigenetic and cell extrinsic parameters that modulate disease expression (Ball, List, and Padron 2016). CMML is a myeloproliferative neoplasm (MPN) / myelodysplastic syndrome (MDS) defined by a persistent clonal monocytosis, with or without dysplasia (Deininger, Tyner, and Solary 2017). Similarly to other myeloid malignancies, the mutatosome of CMML contains a relatively small number of somatic mutations (Merlevede et al. 2016), many of them being associated with age-related clonal hematopoiesis (Mason et al. 2016). The key components of CMML molecular pathology include mutations in DNA methylation (mostly *TET2*), histone modifiers (mostly *ASXL1*), pre-messenger RNA splicing factors (mostly *SRSF2*) and signaling genes, most of them activating the Ras pathway (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Gelsi-Boyer, et al. 2013; Merlevede et al. 2016). Mapping of CMML clonal architecture identified early clonal dominance, intra-tumor heterogeneity in the stem and progenitor cell compartment in which mutations accumulate mostly linearly, and growth advantage to the most mutated cells, as the main characteristics of the disease (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013). Hypomethylating agents, which are commonly used in severe dysplastic forms of the disease (Solary and Itzykson 2017), can restore a balanced hematopoiesis, which correlates with DNA demethylation without any decrease in mutation allele burden measured in circulating monocytes (Merlevede et al. 2016), arguing for a role of epigenetic alterations in disease expression and outcome (Meldi et al. 2015).

The generation of induced pluripotent stem cell (iPSC) lines has been recently used to recapitulate the clonal variations in myeloid malignancies (Chao et al. 2017; Kotini et al. 2017). Since the most



mutated cells demonstrate a growth advantage with myeloid cell differentiation (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013), the clonal heterogeneity of CMML is mostly observed in the CD34-positive hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) compartment in which this growth advantage appears limited. We therefore reprogrammed CD34-positive cells from CMML patients and healthy donors to characterize the hematopoiesis derived from genetically heterogeneous lines, explore the impact of introducing a new mutated allele (SRSF2^{P95H}) on a patient background and determine how hypomethylating drugs affect hematopoiesis derived from cells with heterogeneous patterns of genetic alterations, epigenetic modifications, gene expression and hematopoietic differentiation.

Patient and methods

Human samples. Blood was collected on ethylenediaminetetraacetic acid from a healthy blood cell donor and two patients with a CMML according to the World Health Organization 2016 criteria (Arber et al. 2016), following procedures approved by the relevant ethics committees, with the written informed consent obtained from each patient or donor. **Patient A** was a 85-year old woman with a past history of ischemic cardiopathy who was referred to our Center in January 2012. A monocytosis, which had appeared in 2008, had been neglected during 4 years. At the end of 2011, the occurrence of several infectious events and bone pains induced a dramatic decrease of her performance status, associated with a rapid increase in white blood cell count ($22.8 \times 10^9/L$) with 29% monocytes and a drop in hemoglobin level to 104 g/L and platelet count to $62 \times 10^9/L$. Bone marrow investigation showed 12% blast cells including promonocytes, with dysgranulopoiesis, and megakaryocytic hyperplasia and dysplasia. Diagnosis was CMML-2. No splenomegaly was detected. Flow cytometry analysis of peripheral blood monocytes showed an increase in the classical, CD14⁺,CD16⁻ monocyte subset (>94%) (Selimoglu-Buet et al. 2015). Cytogenetic analysis of bone marrow cells was normal. Whole exome sequencing (WES) of peripheral blood monocytes identified 10 gene mutations, including a founding mutation in *KDM6A*, 2 heterozygous mutations in *TET2*, and a *KRAS*^{G12D} mutation. The patient was treated with Azacytidine, 75mg/m² /day, 7 days every 28 days. After 6 cycles, she was classified as partial responder with a dramatic improvement of her blood cell count that had become normal, excepted a persistent monocytosis at $1.1 \times 10^9/L$ (18% of WBC), with a disappearance of bone marrow blast cell excess but no change in genetic alterations analyzed by WES of sorted monocyte DNA (Merlevede et al. 2016). The treatment was discontinued after 6 cycles, due to poor tolerance. After 3 months, the patient received Hydroxyurea to normalize her WBC. In April 2013, bone marrow control showed an increase in blast cell count to 19%, leading to re-introduce Azacytidine



treatment that induced a partial response. After 19 cycles however, the disease progressed, her general conditions degraded, and she died after six months of palliative care.

Patient B was a 84-year old man with a chronic renal failure who was referred in July 2012 for a monoclonal gammopathy of undetermined significance and a monocytosis. Exploration identified a CMML-0 in the WHO 2016 classification, with bone marrow analysis showing 1% blast cells, 19% monocytes, dysgranulopoiesis and dysmagakaryopoiesis, and a normal karyotype. The white blood cell count was $17.6 \times 10^9/L$ including 11% monocytes and 4% immature myeloid cells. Hemoglobin level was 96 g/L and platelet count was $147 \times 10^9/L$. There was no splenomegaly. WES of sorted monocyte DNA identified 19 mutations, including heterozygous mutations in *TET2*, *ASXL1* and *CBL U2AF2* and the *SRSF2*^{P95L} mutation. In January, the patient condition degraded rapidly, due mostly to comorbidities, leading to death in March 2013.

Generation of iPSCs from CD34-positive cells.

On day -4, primary cryopreserved CMML or age-matched healthy donor CD34⁺ cells were thawed and cultured in CD34⁺ medium with complete StemPro-34 (ThermoFisher, Cat. No. 10639011) supplemented with 50 ng/ml stem cell factor (SCF, Peprotech, Cat. No. 300-07), 1U/ml erythropoietin (EPO, Peprotech, Cat. No. 100-64), 10 ng/ml interleukin-3 (IL-3, Peprotech, Cat. No. 200-03), 10 ng/ml interleukin-6 (IL-6, Peprotech, Cat. No. 200-06), 10 ng/ml Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT3LG, Peprotech, Cat. No. 300-19), 1% non-essential amino acids (NEAA, ThermoFisher Scientific, Cat. No. 11140035) and 1 mM L-glutamine (ThermoFisher Scientific, Cat. No. 25030081) for 5 days at 37°C at 5% O₂ to ensure active proliferation before being infected with non-integrated Sendai virus encoding the Yamanaka human reprogramming factors Klf4, Oct4, Sox2, and c-Myc following the manufacturer's protocol (CytoTune™ -iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, reprogram CD34⁺ cells feeder-dependent, ThermoFisher Scientific, Cat. No. A16518). CMML cells were initially cultured at a density of 5×10^6 cells/ml in a 24-well plate in CD34⁺ medium. On day -3, 0.5 ml of the supernatant was gently removed and replaced by 0.5 ml of fresh CD34⁺ medium. On day 0, Cytotune™ sendai virus was added at an MOI of 5 for 12 hours with 4 µg/ml of Polybrene (Sigma-Aldrich, Cat. No. H9268) at 37° at 5% of O₂. On day 1, cells were centrifuged at 200 x g for 10 min at room temperature and suspended in 0.5 ml of CD34⁺ medium. On day 3, these cells were centrifuged, suspended in complete StemPro-34 without cytokines, and plated on murine embryonic fibroblast (MEF) inactivated by gamma irradiation (RnDSYSTEMS, Cat. No. PSC001). On day 7, medium was changed to 1:1 ratio of complete StemPro-34 and iPSC medium containing DMEM/F12 GlutaMAX supplement (ThermoFisher, Cat. No. 10565018) with 20%



of KnockOut Serum Replacement (KSR, ThermoFisher, Cat. No. 10828028), 1% nonessential amino acids, 1mM L-glutamine, 0.5mg/ml Penicillin-Streptomycin (ThermoFisher, Cat. No.10378016), 10 ng/ml Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, Cat. No. 13256029), and 0.1 mM β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Cat. No. M6250-10ML). On day 8, then every 2 days, the medium was entirely replaced with fresh iPSC medium. After 3-4 weeks, colonies with human pluripotent stem cell morphology were manually picked and expanded. Finally, an iPSC control cell line (here named Co6 for control 6), which has been previously characterized and referred as C1/CHOPWT2.2,(Mills et al. 2013; Antony-Debré et al. 2015). was kindly provided by Dr Weiss

iPSCs maintenance culture

iPSCs were cultured on irradiated inactivated MEFs with iPSC medium for 20 passages, then seeded in feeder-free conditions on Vitronectin recombinant human protein (VTN-N, ThermoFisher, Cat. No. A14700) culture dishes with StemMACS iPS-Brew XF medium (Miltenyi Biotec, Cat. No. 130-104-368)(Kirkeby et al. 2017). and passaged to yield a cell suspension of small colonies (3-10 cells in each) with 0.5 mM EDTA (ThermoFisher, Cat. No. AM9260G) once weekly.(Kirkeby et al. 2017) All iPSCs cell lines used have been repeatedly tested negative for mycoplasma by Plasmotest (InvivoGen, Cat. No. rep-pt1).

Cytospin preparation and staining

Sorted cell populations were centrifuged onto Polysine[®] slides (Thermo, Cat. No. P4981) for 3 minutes at 500g (Cytospin II; Thermo). Slides were air-dried for 1 hour. For May-Grünwald-Giemsa staining, cells were fixed in absolute methanol for 5 min at room temperature, then stained for 20 min with 1:1 ratio of May-Grünwald solution (Sigma-Aldrich, Cat. No. 63590-1L): phosphate buffer pH 6.4, washed in H₂O and transferred to 1:9 ratio of Giemsa solution (Sigma-Aldrich, Cat. No. R03055-82): phosphate buffer for 20 min and analyzed (Dr Véronique Saada in Gustave Roussy hospital).(Klimchenko et al. 2009)

Characterization of pluripotency and karyotype assays

Flow cytometry analysis of intracellular pluripotency markers was performed under the manufacturer's protocol (Human Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit, Cat. No. 560589) with the following conjugated-monoclonal antibodies: Nanog-PE (BDbiosciences, clone N31-355, Cat. No. 560873), Oct3/4-PerCP-Cy[™]5.5 (BDbiosciences, clone 40/oct-3, Cat. No. 560794) and Sox2-Alexa Fluor[®] 647 (BDbiosciences, clone 245610, Cat. No. 560302). Analysis of extracellular pluripotency markers was performed with the following conjugated-monoclonal antibodies: SSEA-4-PE (BDbiosciences, clone MC813-70, Cat. No. 560128), Tra-1-60-FITC



(BDbiosciences, clone TRA-1-60, Cat. No. 560380) and TRA-1-81- Alexa Fluor® 647 (BDbiosciences, clone TRA-1-81, Cat. No. 560793). Mouse studies were performed in compliance with Gustave Roussy laboratory animal care regulations. Teratoma formation assay was performed by adding 10µM Y-27632 (Miltenyi, Cat. No. 130-103-922) to fresh iPSC medium one hour before intramuscular injection of $\sim 2 \times 10^6$ undifferentiated iPSC in 140 µL iPSC medium with undiluted Geltrex™ (60 µL, ThermoFisher, Cat. No. A1413302) to *NOD/SCID/IL2 γ ^{-/-}* mice. After 8 to 12 weeks, tumors were surgically dissected and fixed in 4% formaldehyde, and stained with hematoxylin and eosin for histological analysis (Saliba et al. 2013). Undifferentiated iPSCs were also analyzed by standard cytogenetic methods including mitotic arrest, hypotonic shock and fixation. Briefly, cells incubated with hypotonic solution (0.075M KCL) at 37°C for 20 min were spun down, suspended in fixative solution and incubated at room temperature for 30 min before analyzing metaphases on cytopsin slides using the GTW banding method (Dr. Bilhou-Nabera, Saint-Antoine Hospital). (Saliba et al. 2013).

Hematopoietic differentiation

We used a two-dimensional “monolayer” system to differentiate human pluripotent stem cells (iPSCs) into “primitive” hematopoietic progenitor cells (hHPCs) as described. (J. A. Mills et al. 2014) On day -1, iPSCs were cultured in 100 x 20 mm petri dishes in the presence of 0.5 mM EDTA to reach a 5-10% confluency. On day 0, StemMACS iPS-Brew XF medium was replaced by complete hematopoietic differentiation medium supplemented with 5 ng/ml BMP4 (Peprotech, Cat. No. 120-05), 50 ng/ml VEGF₁₆₅ (Peprotech, Cat. No. 100-20) and 1 µM GSK-3β inhibitor (CHIR99021, Sigma Aldrich, Cat. No. SML1046-5MG). On day 2, this medium was replaced by hematopoietic differentiation medium [Serum free medium (Casadevall et al. 1982) mixed 1:1 with complete StemPro34 medium and supplemented with 1% nonessential amino acids, 1mM L-glutamine, 0.5mg/ml Penicillin-Streptomycin, 0.1mM β-Mercaptoethanol, 1% Insulin-Transferrin-Selenium (ThermoFisher, Cat. No. 41400045), 10% bovine serum albumin (BSA, Hyclone) fraction V, and 50 µg/ml ascorbic acid (Sigma Aldrich, Cat. No. A4403)]. This medium was further supplemented with 5ng/ml BMP4, 50ng/ml VEGF₁₆₅ and 20ng/ml of bFGF. This medium was replaced on day 4 by hematopoietic differentiation medium supplemented with 50ng/ml VEGF₁₆₅ and 5ng/ml bFGF, on day 6 by hematopoietic differentiation medium supplemented with 50ng/ml VEGF₁₆₅, 50ng/ml bFGF, 50ng/ml SCF, and 5ng/ml Flt3LG, and on day 8 by hematopoietic differentiation medium supplemented with 50 ng/ml VEGF₁₆₅, 50ng/ml bFGF, 50ng/ml SCF, 5ng/ml Flt3LG, 10ng/ml Interleukin-6 (IL-6, Peprotech, Cat. No. 200-06) and 50ng/ml thrombopoietin (TPO, kindly provided by Kirin, Japon). hHPCs sorted at day 10-16 (depending on the readout) were suspended in serum-



free medium supplemented with 50ng/ml SCF, 5ng/ml FLT3LG, 10ng/ml IL-3, 10ng/ml IL-6, 50ng/ml TPO, 1U/ml EPO, 10ng/ml GM-CSF (Peprotech, Cat. No. 300-03), 10ng/ml G-CSF (Peprotech, Cat. No. 300-23) and 10ng/ml M-CSF (Peprotech, Cat. No. 300-25) for 10 days, with this medium being renewed every 2 days.

Flow cytometry antibodies

Flow cytometry antibodies for differentiation analysis were purchased from Sony [CD33-BV711 (clone WM53 Cat. No. 2117120), CD16-BV650 (clone 3G8, Cat. No. 2110210), CD15-BV605 (clone W6D3, Cat. No. 2215160), CD34-Pe-Cy7 (clone 581, Cat. No. 2317580), CD36-APC (clone 5-271, Cat. No. 2281040), CD13-APC-Cy7 (clone WM15, Cat. No. 2108550), CD235a-PE (clone HI264, Cat. No. 2345530)], BD horizon™ [HLA-DR-BUV395 (clone G46-6, Cat. No. 564040), CD14-BUV737 (clone M5E2, Cat. No. 564444), CD71-BV786 (clone M-A712, Cat. No. 563768), CD86-APC-R700 (clone 2331, Cat. No. 565149), CD41-PerCP-Cy™5.5 (clone HIP8, Cat. No. 340931) CD42-FITC (clone HIP1, Cat. No. 555472)], and BioLegend [CD123-BV510 (clone 6H6, Cat. No. 306022), CD163-PE-Dazzle™594 (clone GHI/61, Cat. No. 333624)]. DAPI solution was from BDbiosciences (Cat. No. 564907). Cells were analyzed using a BD LSRFortessa™ X-20 (BDbiosciences) and BD LSRFortessa™ (BDbiosciences) on the imagery and cytometry platform of Gustave Roussy hospital (AMMICA, CNRS 3655 & INSERM US23). Data were analyzed with Kaluza analysis software (Beckman Coulter).

Cell sorting

Flow cytometry antibodies for sorting hHPCs include CD34-Pe-Cy7, CD43-APC (BD horizon™, clone 1G10, Cat. No. 560198), and CD14-PE (Sony, clone M5E2, Cat. No. 2109030). Flow cytometry antibodies for monocytes/macrophages cell sorting include CD14-APC (Sony, clone M5E2, Cat. No. 2109040), CD33-BV711, CD16-BV650, CD235a-PE, CD41-BB515 (BD horizon™, clone HIP8, Cat. No. 565237), and CD163-PE-Dazzle™594. Flow cytometry antibodies for megakaryocyte sorting include, CD11b-PE (Sony, clone ICRF44, Cat. No. 2106530), CD13-PE (Sony, clone WM15, Cat. No. 2108520), CD14-PE, CD16-PE (Sony, clone 3G8, Cat. No. 2110040), CD33-PE (Sony, clone WM53, Cat. No. 2117020), CD41-BB515, and CD235a-PE. Sorting of hHPCs (CD34+,CD43+,CD14-,DAPI-), monocytic cells (CD14+,CD33+,CD16+/-,CD163+/-,CD41-,CD235a-,DAPI-) and megakaryocytes (CD41a+, CD11b-,CD13-,CD16-,CD14-,CD33-,CD235a-,DAPI-) was performed on a BD Influx™ Cell sorter (BDbiosciences).

Clonogenic assays

Sorted CD34+, CD43+ cells (hHPCs) were suspended in complete serum free medium without



cytokines at a concentration of 1.25×10^3 /ml, 500 μ l of cell suspension were mixed with 2 mL MethoCult H4434 classic (Stem cell technologies, Cat. No. #04434) and 1mL was plated in duplicate 35-mm dishes.(Antony-Debré et al. 2015) Colonies were scored after 14 days and averaged between duplicates. Images were obtained with AxioVision 4.6 software. For flow cytometry analyses, methocult was solubilized with PBS and analysed with the BD LSRFortessa X-20 cell analyzer. For megakaryocyte progenitor assays, 3×10^3 sorted hHPCs were mixed with 2 ml serum-free fibrin clots in the presence of TPO (10 ng/mL) and SCF (50 ng/mL) and plated in duplicate 35-mm dishes. Colonies were stained with an anti-CD41a monoclonal antibody (BD Pharmingen™, clone HIP8, Cat. No. 555465) and a goat anti mouse igG (H+L) alkaline phosphatase conjugate polyclonal antibody (Thermofisher, Cat. No. A24527) as described(Klimchenko et al. 2009; Antony-Debré et al. 2015). CFU-Mk colonies were scored after 10 days and averaged between duplicated. Images were obtained with AxioVision 4.6 software.

Treatment with 5-azacytidine

On day 0-2, sorted hHPCs were suspended in complete serum free medium supplemented with 50 ng/ml SCF, 5ng/ml FLT3LG, 10ng/ml IL-3, 10ng/ml IL-6, 50ng/ml TPO, 1U/ml EPO, 10ng/ml GM-CSF, 10ng/ml G-CSF and 10ng/ml M-CSF for 10 days. 10 nM decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine; Sigma Aldrich, Cat. No. 13656) were added every day for 3 days. On day 10, hematopoietic cells were analyzed by flow cytometry using the BD LSRFortessa X-20 cell analyzer.

Whole exome sequencing

We collected DNA from sorted CD14+ monocytes and sorted CD3+ T cells. Two hundred ng of genomic DNA was sheared with the Covaris S2 system (LGC Genomics / Kbioscience). DNA fragments were end-repaired, extended with an 'A' base on the 3' end, ligated with paired-end adaptors with the Bravo Platform (Agilent) and amplified (six cycles). Exome-containing adaptor-ligated libraries were hybridized for 24 h with biotinylated oligo RNA baits, and enriched with streptavidin-conjugated magnetic beads using SureSelect V5 no UTR (Agilent). The final libraries were indexed, pooled and sequenced on Illumina HiSeq-2000 sequencer (Genomic platform, AMMICa, CNRS 3655 & INSERM US23). Raw reads in FASTQ format from each exome sequencing lane were aligned to the reference human genome hg19 (Genome Reference Consortium GRCh37) using BWA 0.5.9 (Burrows–Wheeler Aligner) backtrack algorithm with default parameters. PCR duplicates were removed with Picard (<http://picard.sourceforge.net>) version 1.76. Local realignment around indels and base quality score recalibration were performed using GATK 2.0.39 (Genome Analysis ToolKit). Statistics on alignment and coverage are given in Supplementary Table



2. SNVs and indels were called with VarScan2 somatic 2.3.2. Reads and bases with a Phred-based quality score ≤ 20 were ignored. Variants with somatic P value below 10^{-4} (or 10^{-3} for samples with mean coverage $< 100 \times$ or contamination $> 15\%$ in CD3+ control sample) were reported. In addition to the Fisher's exact test of VarScan, we required (variant allele frequency in the tumour sample – variant allele frequency in the normal sample) $\geq 15\%$ to distinguish somatic from germline variations. Variants were annotated with Annovar. Mutations were searched in 1000G (April 2012) and Exome Sequencing Project (ESP5400). Conservation of the position was predicted by PhyloP and the effect of the mutation was predicted by SIFT, Polyphen2, LRT and MutationTaster. We excluded variants reported in dbSNP version 129, filtered variants located in intergenic, intronic, untranslated regions and non-coding RNA regions, and removed synonymous SNVs and variants with mapping ambiguities. A mutation was reported as present if variant allele frequency (VAF) $\geq 4\%$ already described (Merlevede et al. 2016).

Genome-wide DNA methylation by Enhanced Reduced Representation Bisulfite Sequencing (eRRBS)

Twenty-five ng of high-molecular weight genomic DNA were used to perform the ERRBS assay as described (Y. Park et al. 2014) and sequenced on a HiSeq2000 Illumina sequencer. 50 bp reads were aligned against a bisulfite-converted human genome (hg19) using Bowtie and Bismark (Krueger and Andrews 2011). Downstream analysis was performed using R version 3.0.3, Bioconductor 2.13 and the MethySig 0.1.3 package. Only genomic regions with coverage between 10 and $500 \times$ were used for the downstream analysis. DMR were identified by first summarizing the methylation status of genomic regions into 25-bp tiles and then identifying regions with absolute methylation difference $\geq 25\%$ and FDR $< 10\%$. DMRs were annotated to the RefSeq genes using the following criteria: (i) DMRs overlapping with a gene were annotated to that gene, (ii) intergenic DMRs were annotated to all neighbouring genes within a 50-kb window, and (iii) if no gene was detected within a 50-kb window, then the DMR was annotated to the nearest TSS, already described (Merlevede et al. 2016).

Mutational analysis

DNA was extracted with QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). After PCR amplification of target exons, sequencing reactions were carried out using the BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequencing reactions were run on a 96-capillary 3130xl DNA Analyzer[®] (Applied Biosystems). Sequence analysis and alignment was performed with ApE[®] software. Digital images were taken with ApE[®] software.

CRISPR/Cas9-mediated SRSF2 P95H knock-in

We introduced SRSF2^{P95H} in 2 wild-type iPSC (Co3, Co5) and 2 CMML-iPSC (A2, A3) lines. On day -1, iPSC cell lines were dissociated with 0.5 mM EDTA solution into single cells and plated on Matrigel.



On day 0, these cells were transfected with 2 vectors gRNA/Cas9 (Supplemental figure 9). On day 1, medium was replaced by fresh StemMACS-iPS Brew medium. On day 3, transfected-cells were dissociated and only viable GFP-positive cells were sorted and replated on Matrigel. On day 10-14, transfected cells were dissociated and only viable mCherry-positive cells were sorted and replated on Matrigel. On day 28, mCherry-positive cells were dissociated into single cells and plated on matrigel. On day 29, mCherry-positive cells were transfected with flippase vector. On day 30, medium was replaced by fresh StemMACS-iPS Brew medium. On day 31, cells were dissociated and only viable GFP negative mCherry negative were sorted. GFP negative and mCherry negative cells were replated on matrigel. On day 45, 12 GFP and mCherry negative colonies were manually picked and expanded in order to screen the insertion of the SRSF2^{P95H} mutation by Sanger sequencing.

Oligonucleotide aCGH

A male or female control was always used as the reference. Genomic DNA was extracted using Qiagen QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and digested with restriction enzymes, which was checked by Agilent Bioanalyzer on DNA 7500 chips (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). After labeling with Cy3-dUTP or Cy5-dUTP, respectively, using Agilent Genomic DNA Labeling Kit PLUS, samples were purified using Microcon YM-30 filters (Millipore, Billerica, MA). Hybridization was carried out on Agilent 244K arrays for 24 hours at 65°C in a rotating oven (Robbins Scientific, Mountain View, CA) at 20 rpm, followed by appropriate washing steps. Scanning was performed with an Agilent G2505C DNA Microarray scanner using default parameters. Quantification of Cy5 and Cy3 signals from scans was performed with Feature Extraction v10.5.1.1 (Agilent Technologies) using default parameters.

RNA sequencing

RNA integrity (Score ≥ 7.0) was checked on Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) and quantity was determined using Qubit (Invitrogen). SureSelect Automated Strand Specific RNA Library Preparation Kit was used according to manufacturer's instructions with the Bravo Platform. Briefly, 50 ng of total RNA sample was used for poly-A mRNA selection using oligo(dT) beads and subjected to thermal mRNA fragmentation. The fragmented mRNA samples were subjected to cDNA synthesis and were further converted into double stranded DNA using the reagents supplied in the kit, and the resulting dsDNA was used for library preparation. The final libraries were bar-coded, purified, pooled together in equal concentrations and subjected to paired-end sequencing on HiSeq-2000 sequencer (Illumina).



Statistical analysis (Allan)

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software. Data are shown as the mean with standard deviation (SD). Different statistical tests were performed depending of the experiment. Each statistical test is described in the legend of the figure. Investigators were not blinded to the different groups.

Data and Software Availability (Allan)

The accession numbers for the RNA-seq and ERRBS data reported in this paper are XXXX

Results

Reprogramming of CD34-positive cells from CMML patients captures a part of disease genetic heterogeneity.

We collected CD34-positive bone marrow cells from two CMML patients. Somatic gene mutations had been identified by whole exome sequencing in peripheral blood monocytes of these patients, using sorted CD3⁺ T cell as controls (Merlevede, 2016). Patient A demonstrated 13 mutations in coding sequences of her monocyte DNA, including two distinct mutations in *TET2* gene (frameshift deletion, S1691fs and stopgain SNV, R1516X), a heterozygous mutation in *KRAS* (nonsynonymous SNV, G12D) and a heterozygous mutation in *KDM6A* (stopgain SNV, R61X). Patient B demonstrated 23 somatic mutations in coding sequences of his monocyte DNA, including heterozygous mutations in *TET2* gene (frameshift deletion, 1282-1288del), *ASXL1* (frameshift mutation, G643fs), *SRSF2* (nonsynonymous SNV, P95L) and *U2AF2* (nonsynonymous SNV, L187V) and two heterozygous mutations in *CBL* (stopgain SNV, R206X and nonsynonymous SNV, H398Q). We collected also CD34-positive cells from an age-matched healthy donor without detected age-related clonal hematopoiesis. Using non-integrating Sendai virus, we transduced CD34-positive cells of these 3 donors with iPSC reprogramming factors (Sox2, Klf4, Oct4 and c-Myc) to generate iPSC lines (**figure 1a**). All the clones demonstrated pluripotency features, including morphology (**figure S1a**), expression of pluripotency markers (**figure 1b**) and formation of teratomas when injected subcutaneously into immunodeficient mice (**figure 1c & S1b**). We discarded the clones in which cytogenetic analyses identified abnormalities induced by reprogramming, *e.g.* a number of clones generated from patient B demonstrated a trisomy 17 (**figure S1c**). We selected 10 clones without induced chromosome abnormality (**figure 1d**) for further analysis (patient 1, N=5; patient B, N= 1; Healthy donor A, N = 4). We used an additional, independently generated control iPSC clone kindly provided by Dr Weiss (Mills et al, Blood 2013). Whole exome sequencing of patient A clones indicated that we had captured a part of the genetic heterogeneity of her leukemic clone (**figure 1e & figure S1d**). Serial genetic analyses of the unique iPSC clone established from patient



B cells, which shown a SRSF2 P95H mutation, detected a deletion of the mutated allele located in 17q25.1 between passage 15 and 20 (**figure 1f**), generating cells haplo-insufficient for *SRSF2* (**figure 1g**). Because of this spontaneous deletion and the difficulties in expanding this clone, we focused subsequent analyses on those established from patient A (5 lines) and the two healthy donors as controls (5 lines). From patients A, we distinguished 2 genetic backgrounds, with and without *KRAS*^{G12D} mutation and from patient B, we distinguished 3 genetic backgrounds (**figure S2a** & **figure S2b**). Variant allele frequencies in the various genes are shown on **figure 1e**. Altogether, CMML cells can be successfully reprogrammed into iPSCs, which captures a part of the disease genetic heterogeneity.

CMML-iPSCs derived hematopoietic cells recapitulate the main features of the disease in methylcellulose. We next induced the differentiation of healthy donor-iPSCs and CMML-iPSCs into hematopoietic progenitors using a previously described two-dimensional monolayer system (REF). After 14 days, a population of cells with a down-regulated expression of pluripotent markers (not shown) and CD34 and CD43 expression was observed (**figure S3a**). CD34⁺, CD43⁺ cells were sorted by fluorescence-activated cell sorting (FACS) and plated for 10 days in methylcellulose to evaluate hematopoietic colony forming potential in the presence of stem cell factor (SCF), interleukin-3 (IL-3), erythropoietin (EPO), and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) (**figure 2a**). The total number of colonies generated by healthy donor- and CMML-iPSC derived hematopoietic progenitors was similar (**figure 2b & S4a**) but the fraction of clusters (colonies < 50 cells) generated by *KRAS* wildtype cells was significantly higher than that generated by healthy donor- and *KRAS*^{G12D}-mutated cells (**figure 2c, 2d, S4b & S4c**). These latter clones also produced larger granulocyte-macrophage (CFU-GM) and macrophage (CFU-M) colonies (**figure 2d**). Distinctive analysis of CFU-GEMM, CFU-GM, BFU-E/CFU-E, CFU-G and CFU-M revealed a significant increase in the number of granulocyte-macrophage colonies (**figure 2e**), while the number of granulocytic, erythroid and multipotent progenitor colonies was decreased in CMML- compared to healthy donor iPSC derived colonies, respectively (**figure 2e, 2f & S4d**). Flow cytometry analysis of the cells collected from these colony assays demonstrated a dramatic increase in the fraction of CD14⁺ cells among colonies derived from CMML-iPSC compared to healthy donor iPSCs at the expense of CD33⁺ & CD123⁺, CD235a⁺ or CD41⁺ populations, whatever the *KRAS* gene status (**figure 2g & S4e**). A summary of these colony assays is shown on **figure 2h**.

Phase contrast microscopy analysis of colonies identified cells with a fibroblast-like, fusiform shape in CFU-M generated by healthy donor-derived iPSCs while such cells were hardly detected in CFU-M generated from CMML-derived iPSCs (**Figure 3a, 3b & S5a**), suggesting a defect in



macrophage differentiation of CMML-derived clones. Flow cytometry analysis of cells growing in methylcellulose indicated that CMML-derived iPSCs generated significantly less CD14⁺ cells expressing also CD16 and CD163, a characteristic phenotype of macrophages, than healthy donor iPSC-derived cells (**Figure 3c, S5b & S5c**). Importantly, the same defect in the generation of CD14⁺ cells expressing both CD16 and CD163 was detected when iPSC-derived hematopoietic cells were induced to differentiate in liquid culture (**Figure 3d, 3e, S5d & S5e**).

Since the CMML patient whose CD34⁺ cells were used to generate iPSC clones demonstrated a thrombocytosis and a megakaryocytic dysplasia, we performed coagulum assays in the presence of SCF and TPO to analyze the clone ability to generate megakaryocytes and platelets (**figure 4a**). CMML-derived clones were observed to generate a similar number of colonies (**figure 4b**). However, these colonies were much larger in size with CMML-derived clones as compared to controls (**figure 4c**): the fraction of clones with more than 50 cells and 10 to 50 cells generated by CMML-derived cells was significantly higher than those generated by wild-type clones (**Figure 4d, 4e & S6a**). We did not detect any significant difference in the fraction of CD42⁺ cells among CD41⁺ cells (**Figure 4f & S5b**). We also analyzed the fraction of iPSC-derived megakaryocytes that produce platelet, which was lower in CMML iPSC-derived cells (**Figure 4g, 4h & S6c**).

CMML-iPSCs derived hematopoietic cells also recapitulate the features of patient disease in liquid culture. CD34⁺, CD43⁺ cells generated from iPSC lines and sorted by flow cytometry were also cultured in liquid medium in the presence of SCF, IL-3, IL-6, EPO, GM-CSF, thrombopoietin (TPO), Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) for 10 days in liquid medium (**figure 5a**). The quantity of cells generated by each clone after 10 days in culture was not significantly different and the number of viable cells at the end of the culture was also similar, except for patient-derived clone A1 that demonstrated more dead cells, as demonstrated using DAPI staining (**figure 5b & 5c**). A multiparameter flow cytometry analysis was used to measure the fraction of each cell population obtained in these cultures (**figure S2b**). Patient-derived clones, excepted A1, generated mostly CD14⁺, CD33⁺ monocytic cells (**figure 5d, 5e & S7a**), representing ~40% of the whole population of cells. Wild-type clones generated a majority of CD33⁺ or CD123⁺, CD14⁻, CD41⁻, CD235a⁻ cells (**figure 5f, 5g, S7b & S7c**) while A1 clone showed a specific behavior with an increased production of CD235a⁺, CD14⁻, CD41⁻ erythroid cells as compared to healthy donor and other CMML-derived clones (**figure 5h & S7d**). Finally, in these culture conditions, the generation of CD41⁺ cells was not significantly different between healthy donor and patient-derived clones (**figure 5h & S7e**). Altogether, these results indicated a bias of patient-derived cells towards

Université Paris-Saclay



monocyte production in these liquid culture conditions, excepted for the markedly distinct clone A1 that demonstrates a bias towards erythroid cell production (**figure S7d**). As a reminder, these liquid cultures also detected the defective differentiation of monocytes into macrophages (**figure 3c, 3d, 3e, S5b, S5c, S5d, S5e**) and the patient characteristic dysmegakaryopoiesis with a defective generation of platelets (**figure 4f, 4g, 4h, S6b, S6C**). A summary of this clonal heterogeneity is shown on **figure 5j (figure S7f & S7g)**.

Hypersensitivity to GM-CSF, attested by an increased formation of CFU-GM when bone marrow mononucleated cells are cultured in methylcellulose, is a frequently observed feature of CMML progenitors, especially those with mutations in signaling genes (Padron et al. 2013; Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013). We tested the proliferation and differentiation of healthy donor and CMML-iPSC derived hematopoietic progenitors when cultured in liquid medium in the presence of SCF and increasing doses of GM-CSF, alone or in combination with M-CSF, or G-CSF alone, or M-CSF alone. We did not detect any significant increase in cell proliferation, whatever the iPSC clone, the cytokine, and the GM-CSF concentration in these cultures condition (**Figure 6a**). *KRAS*-mutated clones differentiated also into CD14⁺ monocytes, even in the absence of GM-CSF or M-CSF (**figure 6b & S8a**). M-CSF added to SCF promoted monocytic differentiation of every cell clone, derived from either healthy donor or CMML cells, whereas the combination of M-CSF and GM-CSF promoted monocytic differentiation of CMML-derived cells only (**figure 6b & S8a**). Actually, except clone A1, CMML-derived clones demonstrated an increased differentiation into granulocytes, even in the absence of cytokines added to SCF (**Figure 6c & S8a**). This increased differentiation could explain the decreased proliferation of cells in liquid medium (**Figure 6a & S8a**).

***SRSF2*^{P95H} mutation modifies the phenotype of CMML-iPSC derived hematopoietic progenitors.**

We then explored if knock-in of *SRSF2*^{P95H} (**figure S9a, S9b & S9c**), a mutation observed in ~50% of CMML patients but absent in our reprogrammed cells, in a CMML-derived iPSC could modify the differentiation of hematopoietic progenitors generated from these iPSCs. Using the CRIPR/Cas9 technology, the mutation was introduced in A3 clone that otherwise exhibits a *KRAS*^{G12D} mutation (**figure 1e**). In liquid culture, *SRSF2* mutation did not decrease the number of generated cells (**figure 1a**) but decreased the fraction of viable cells as compared to parental cells cultured in parallel conditions (**figure 7b**). *SRSF2* mutation also significantly promoted the generation of CD14⁺ monocytes at the expense of immature CD123⁺ cells (**figure 7c & 7d**) without affecting other cell populations (**figure S10a, S10b & S10c**). When plated in methylcellulose, cells with *SRSF2*^{P95H} mutation generated more colonies (**figure 7e**) whose size remained unchanged (**figure 7f**). Cells



with SRSF2^{P95H} mutation did not change the fraction of CFU-GM, CFU-E, CFU-M and CFU-GEMM (**figure 7g, 7h & 7i**). Altogether, especially in liquid culture, the phenotype of A3 clones expressing SRSF2^{P95H} became closer of that observed with A5 clone (**figure 7j**).

The hypomethylating agent decitabine modifies the phenotype of CMML-iPSC-derived hematopoietic progenitors. Hypomethylating agents are commonly used to treat severe, dysplastic forms of CMML and restore a balanced hematopoiesis, which correlates with DNA demethylation, while having limited impact on mutation allele burden in circulating monocytes and myeloid progenitors (Solary and Itzykson 2017; Merlevede et al. 2016). We treated CD34⁺ CD43⁺ cells generated from healthy donor and CMML-iPSCs with 10 nM, 20 nM, 50 nM and 100 nM decitabine for 3 days in liquid myeloid differentiation culture containing all the hematopoietic cytokines, and harvested the cells at day 3 to measure the demethylating effect and the toxicity of the drug. At 10 nM, decitabine demonstrated a demethylating effect while having limited toxicity (**figure S11a and S11b**). Importantly, iPS clones demonstrated a similar level of demethylation as compared to primary CD34⁺CMML cells. (**figure S11a**). Then, CD34⁺ CD43⁺ cells generated from healthy donor and CMML-iPSCs were treated with 10 nM decitabine for 3 days and harvested at day 7 for flow cytometry analysis. The drug reduced the number of generated cells (**figure S11c**) but did not affect the number of viable cells (**figure S11d**). Upon treatment, hematopoietic differentiation, especially the production of CD14⁺ cells, remained unchanged in healthy donor-iPS derived cells and cells derived from clone A1 and clone A5 whereas their number dramatically decreased in A3S clone (**figure 8a & S11e**). In clone A3S, hematopoietic repartition at day 7 became closer to that observed with healthy donor iPSC-derived clones (**figure 8a**), in accordance with the more balanced hematopoiesis observed in responding patients. For example, we observed less monocytic differentiation and more granulocytic differentiation with a slightly increased ratio of megakaryocytic and erythrocytic differentiation compared to untreated A3S.

Genetic, epigenetic and functional heterogeneity among CMML-iPS clones.

Supplemental figure 12

Figure encore incomplète, résultats de RNAseq en attente

Discussion

By capturing two genetically distinct subclones through reprogramming CD34-positive cells of a CMML patient into iPSCs, we demonstrate that epigenetic and functional heterogeneity, including response to hypomethylating drugs, goes well beyond the genetic features, as suggested by the heterogeneous presentation of the disease (Ball, List, and Padron 2016). These multiple levels of clonal heterogeneity suggest that the complete eradication of a malignant clone may require a combination of complementary strategies.

Somatic mutations in epigenetic genes can be detected in leukemic cells of almost every CMML patient (Merlevede et al. 2016) and epigenetic modifications are a constant feature of these cells (Meldi et al. 2015). *TET2* is the most frequently mutated gene in this disease and the role of TET2 enzyme in the expression of pluripotency genes such as *NANOG* (Doege et al. 2012; P. Wang et al. 2013; Bagci and Fisher 2013) could have precluded the reprogramming of *TET2*-mutated CMML cells. We show here that *TET2* mutations do not preclude the reprogramming of CD34⁺ hematopoietic cells, which enforce the recent demonstration that TET enzymes are involved in the mesenchymal-epithelial transition required for reprogramming of specific cell types but dispensable for reprogramming of other cells (L. David and Hirsch 2014).

By reprogramming CMML CD34⁺ cells of another patient with pathogenic variants in two distinct splicing genes, we demonstrate that two such variants can coexist in a unique leukemic cell, which remained an open question (S. C.-W. Lee and Abdel-Wahab 2016). However, iPSC established from this patient cells hardly differentiated into hematopoietic cells and developed kind of clearing mechanisms, either through acquisition of an additional chromosome 17 or through loss of heterozygosity at *SRSF2* locus. Mutated *U2AF1* (also known as *U2AF35*) was shown to be requested for establishment but not maintenance of transformation and its ability to interfere with cell differentiation through causing a partial defect in autophagy machinery (S. M. Park et al. 2016) could possibly account for the difficulties in keeping these cells in culture. The instability and limited differentiation capabilities of clones generated from this second patient led us to focus our efforts on those established from the first patient.

Hematopoietic differentiation of CD34⁺, CD43⁺ progenitors generated from iPSCs established from patient A CD34⁺ cells demonstrated an increased production of granulomonocytic colonies, a defective differentiation of monocytes into macrophages, and an increase in the number and size of megakaryocytes, but a decrease in the production of platelets by these megakaryocytes, as compared to healthy donor iPSCs. All these observations recapitulate the disease features



observed in the patient. The increased number of granulo-monocyte colonies may be related to GM-CSF hypersensitivity of myeloid progenitors, which was shown to promote STAT5 transcription factor phosphorylation (Kotecha et al. 2008; Padron et al. 2013). While this effect may be increased by activating mutations of Ras pathway genes such as KRAS^{G12D}, as suggested by clinical correlations (Padron et al. 2013; Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013) and further supported by analysis of JMML-derived iPSCs (Gandre-Babbe et al. 2013; Mulero-Navarro et al. 2015), we did not observe any increase in the proliferation of iPSC-derived hematopoietic cells in the presence of stem cell factor and increasing concentration of GM-CSF in liquid culture. Furthermore, in the presence KRAS^{G12D}, the number of cells generated in liquid culture was decreased, which was related to an increased granulomonocytic differentiation in these culture conditions.

While hematopoietic cells generated by reprogrammed cells recapitulated the main features of the patient disease, they also demonstrated significant intraclonal heterogeneity that could not be explained by the sole genetic alterations. Since genetic analyses have been focused on DNA coding regions, we cannot exclude some genetic heterogeneity in non-coding regions. However, while recurrent and functionally relevant somatic mutations were detected in solid tumors, e.g. in *TERT* promoter (Horn et al. 2013; Nault et al. 2013), whole genome sequencing of CMML cells failed to identify such a recurrent event so far (Merlevede et al. 2016). A role for epigenetic effects of cell reprogramming (Chao et al. 2017) in this heterogeneity is also unlikely as iPSCs established independently from two healthy donors have a very similar and reproducible behavior, even though the methylation pattern of one of them (clone Co1) appears to differ from that of other healthy donor-derived clones. Finally, another unlikely hypothesis is the reprogramming of cells with intrinsic initial heterogeneity in their differentiation potential (Perié et al. 2014; Velten et al. 2017; Yu et al. 2017) as these discrepancies might be erased by reprogramming.

A more likely explanation is the epigenetic heterogeneity of the leukemic clone, as it was shown recently that maturation of pluripotent stem cell-derived hematopoietic precursors to mature blood largely depends on the amount and pattern of DNA methylation acquired during reprogramming (Nishizawa et al. 2016). In addition, intraclonal epigenetic heterogeneity may exist before reprogramming as a marker of clonal evolution (Landau et al. 2015; H. Pan et al. 2015). Accordingly, we have shown the potential role of DNA methylation in CMML clinical expression (Aucagne et al. 2011). We have also demonstrated that treatment of CMML patients with a demethylating agent could restore a balanced hematopoiesis without eradicating the mutated clone (Merlevede et al. 2016; Unnikrishnan et al. 2017) and that the DNA methylation pattern by



itself could predict the response to demethylating drugs (Meldi et al. 2015).

To further explore the impact of genetic abnormalities in the behavior of hematopoietic cells, we used gene editing techniques to introduce SRSF2^{P95H} mutation in one of the patient clones. By exploring the clone architecture by single cell analyses in CMML patients, we have shown that the most mutated cells co-existed with less mutated cells in the stem and progenitor cell compartment and demonstrated a dramatic growth advantage with differentiation (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013). Accordingly, introduction of a new mutation in one of the clones, although slightly weakening these cells whose death rate was increased, promoted their differentiation and the generation of CD14+ monocytes in liquid culture, mimicking the situation observed in patient cells. Of interest, this effect was partially corrected by a short exposure to the demethylating agent decitabine, which otherwise demonstrate limited effects on control and the other patient-derived clones.

Taken together, our investigations highlight the multiple levels of intraclonal heterogeneity that exist in a malignancy whose genetic heterogeneity remains limited. Patient cell reprogramming allows understanding how this cell-autonomous heterogeneity, which may be further influenced by clonal interference and non-cell autonomous factors (Marusyk et al. 2014), generate disease phenotypic traits. Such investigations will be essential to generate therapeutic strategies aiming at eradicating a malignant clone.



Figure legends

Figure 1. CD34-positive cells from CMML patients can be reprogrammed into pluripotent stem cells. **a.** CD34-positive cells from two patients diagnosed with chronic myelomonocytic leukemia (CMML) and one age-matched healthy donor were reprogrammed through infection with Sendai virus encoding the transcription factors Sox2, Klf4, Oct4, and c-Myc (SKOM) before characterization and selection of indicated induced-pluripotent stem clones (iPSCs). Another iPSC control cell line (Co6 for control 6) was kindly provided by Dr. Weiss; **b.** Flow cytometry analysis of intracellular (Nanog, Oct4, Sox2) and extracellular (Tra-1-81, SSEA-4, Tra-1-60) pluripotency markers by flow cytometry in each selected clone; **c.** Each iPSC injected subcutaneously into NSG mice generated a teratoma, as observed after H&E staining, *e.g.* light microscopy analysis of the tumor generated by A1 clone identifies mesoderm, including bone and cartilage, endoderm, including intestinal-like mucin-secreting cells, and ectoderm (neural tubes); **d.** Cytogenetic analysis of A1 clone showing the lack of chromosomal aberration; **e.** Whole exome sequencing of DNA collected from sorted peripheral blood monocytes (in black) and from the 5 iPS clones selected from patient A (each color indicates a specific clone), showing the detection of two genotypes with 10 and 13 somatic variants, respectively; **f.** Sanger sequencing of *SRSF2* gene in B2 clone at passage 15 and passage 20, showing the loss of initially detected *SRSF2*^{P95L} mutation; **g.** Comparative genomic hybridization of B2 iPS clone at passage 20, showing a deletion in 17q25.2.

Allan Beke et al, Figure 1

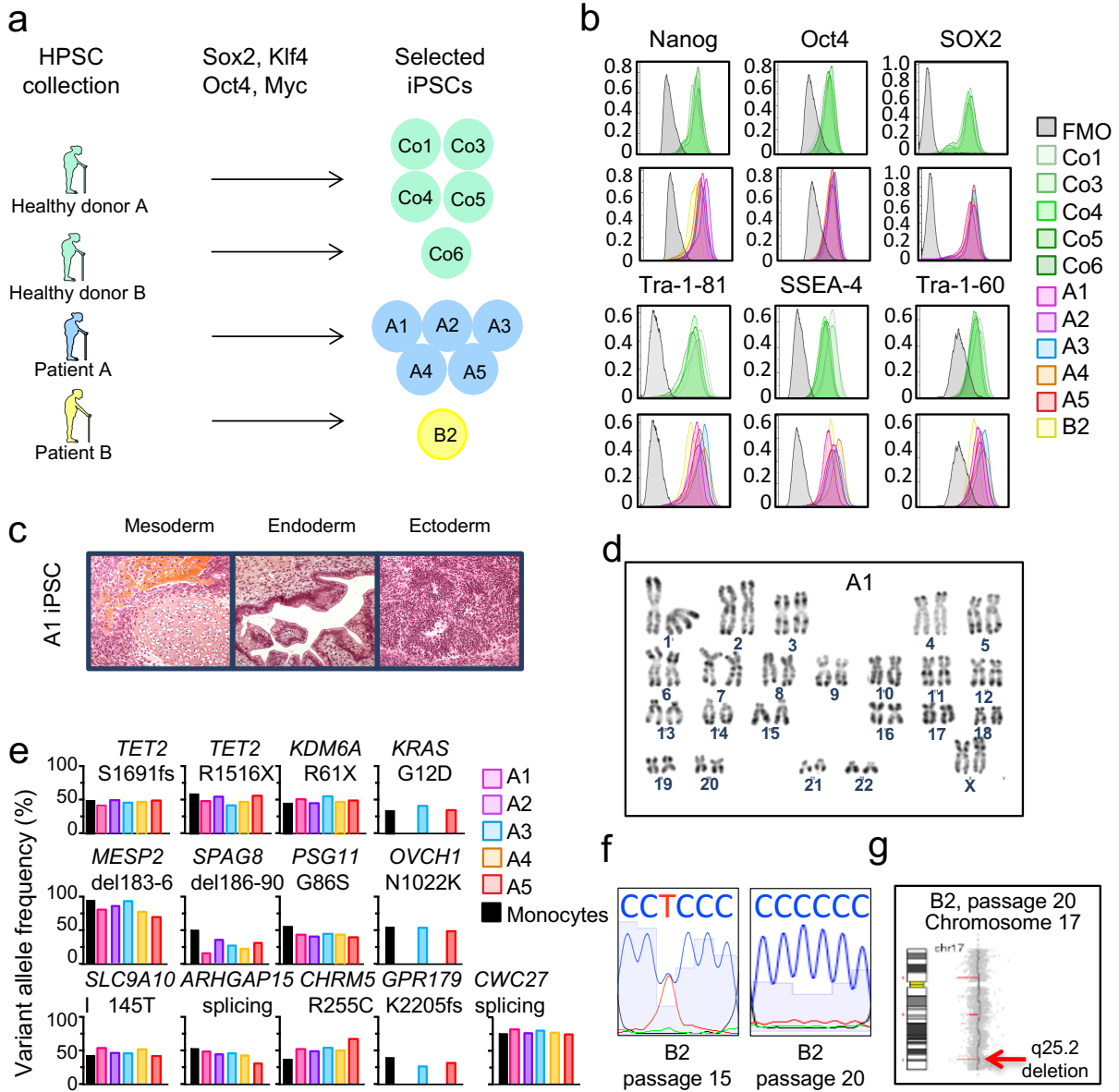


Figure 2. Hematopoietic cells derived from CMML patient are biased toward the monocytic lineage. **a.** Healthy donor- and CMML-iPSC derived CD34⁺, CD43⁺ hematopoietic cells were sorted and plated for 14 days in methylcellulose in the presence of 50 ng/ml stem cell factor (SCF), 10 ng/ml interleukin-3 (IL-3), 1U/ml erythropoietin (EPO), and 10 ng/ml granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) before analyzing the generated colonies; **b.** Total number of colonies generated by plating 5,000 cells in methylcellulose for 14 days. Co represents five healthy control iPSCs (Co1, Co3, Co4, Co5, Co6) and A represents the five patient A-derived iPSCs (A1 to A5), unpaired test T; **c.** Fraction of clusters, as defined by colonies < 50 cells, among total colonies shown in B, separating results obtained with *KRAS* wildtype (A1,A2,A4) and *KRAS* mutated (A3,A5) iPSC-derived hematopoietic cells, Kruskal-Wallis test; **d.** Representative CFU-GM (colony forming unit-granulocyte macrophage) and CFU-M (colony forming unit - macrophage) generated by indicated iPSC clones and visualized by light microscopy. Scale bars indicate magnification; **e.** Fraction of CFU-GM, CFU-M and CFU-G (colony-forming unit-granulocyte) among colonies shown in b (Co and A as in b); **f.** Fraction of erythroid colonies (CFU-E: colony-forming unit-erythroid. BFU-E: burst-forming unit-erythroid) and CFU-GEMM (colony-forming unit-granulocyte-erythroid-monocyte-megakaryocyte) among colonies shown in b (Co and A as in b), unpaired test T; **g.** Flow cytometry analysis of CD14⁺ cells in colonies generated by indicated clones in methylcellulose, Kruskal-Wallis test; **h.** Summary of the colonies generated by five healthy donors and five CMML patient-iPSC derived hematopoietic progenitors. (Bars indicate mean +/- SD. *, P<0.05; ** P<0.01; ***, P<0,001 ****, P<0.0001)

Allan Beke et al, Figure 2

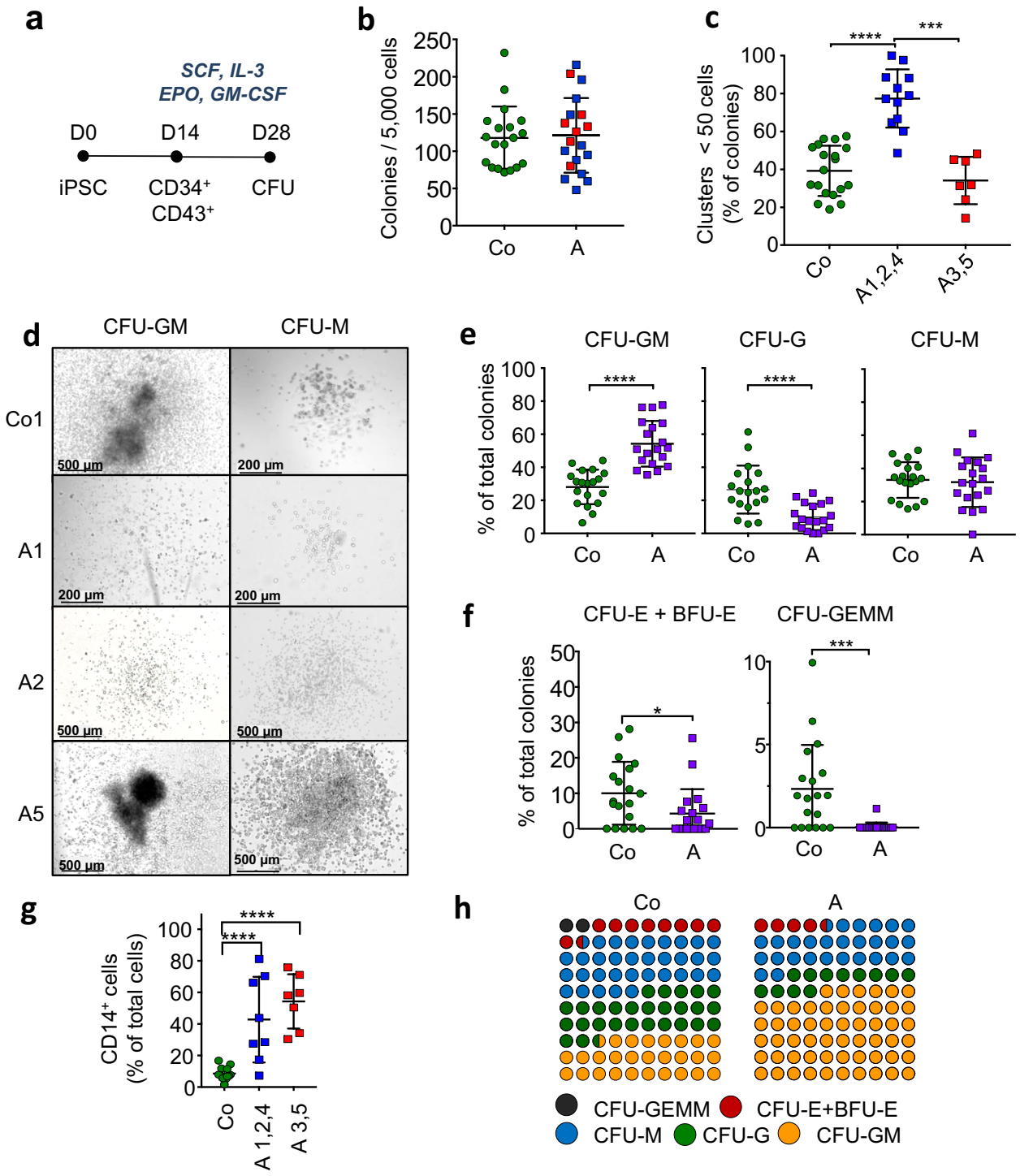


Figure 3. Defective maturation of CMML-iPSC derived hematopoietic cells into macrophages. a. Representative morphology of CFU-M generated by control- (Co6) and CMML- (clone A5) iPSC-derived hematopoietic cells cultured in methylcellulose as described in Figure 2a. Light microscopy visualization; scale bar indicates magnification. The rectangle is a zoom on the fibroblast-like shape of macrophages in the Co6 culture, which was not observed in A5-derived colonies; **b.** Fraction of cells with a. fibroblast-like shape in CFU-M derived from four control and five CMML iPSC-derived hematopoietic cells; unpaired test T; **c.** Flow cytometry analysis of cells expressing both CD16 and CD163 in CD14⁺ cells collected from colonies generated by five healthy donor-(Co1, Co3, Co4, Co5, Co6) and five CMML (A1 to A5) -iPSC derived hematopoietic cells plated in methylcellulose, Kruskal-Wallis test; **d.** Representative flow cytometry analysis of cells expressing CD16 and CD163 among CD14⁺ cells collected from control (Co3) and CMML (clone A2) iPSC-derived hematopoietic cells cultured in liquid medium; **e.** Flow cytometry analysis of cells expressing CD16 and CD163 among CD14⁺ cells collected from the five healthy donor, three *KRAS* wildtype and two *KRAS*^{G12D} CMML iPSC-derived hematopoietic cell samples in liquid culture. Green dots, healthy donor derived clones; Blue squares, *KRAS* wildtype CMML-derived clones; Red squares, *KRAS*^{G12D} CMML-derived clones, Kruskal-Wallis test. (Bars indicate mean +/- SD. *, P<0.05; ** P<0.01; ***, P<0,001 ****, P<0.0001)

Allan Beke et al, Figure 3

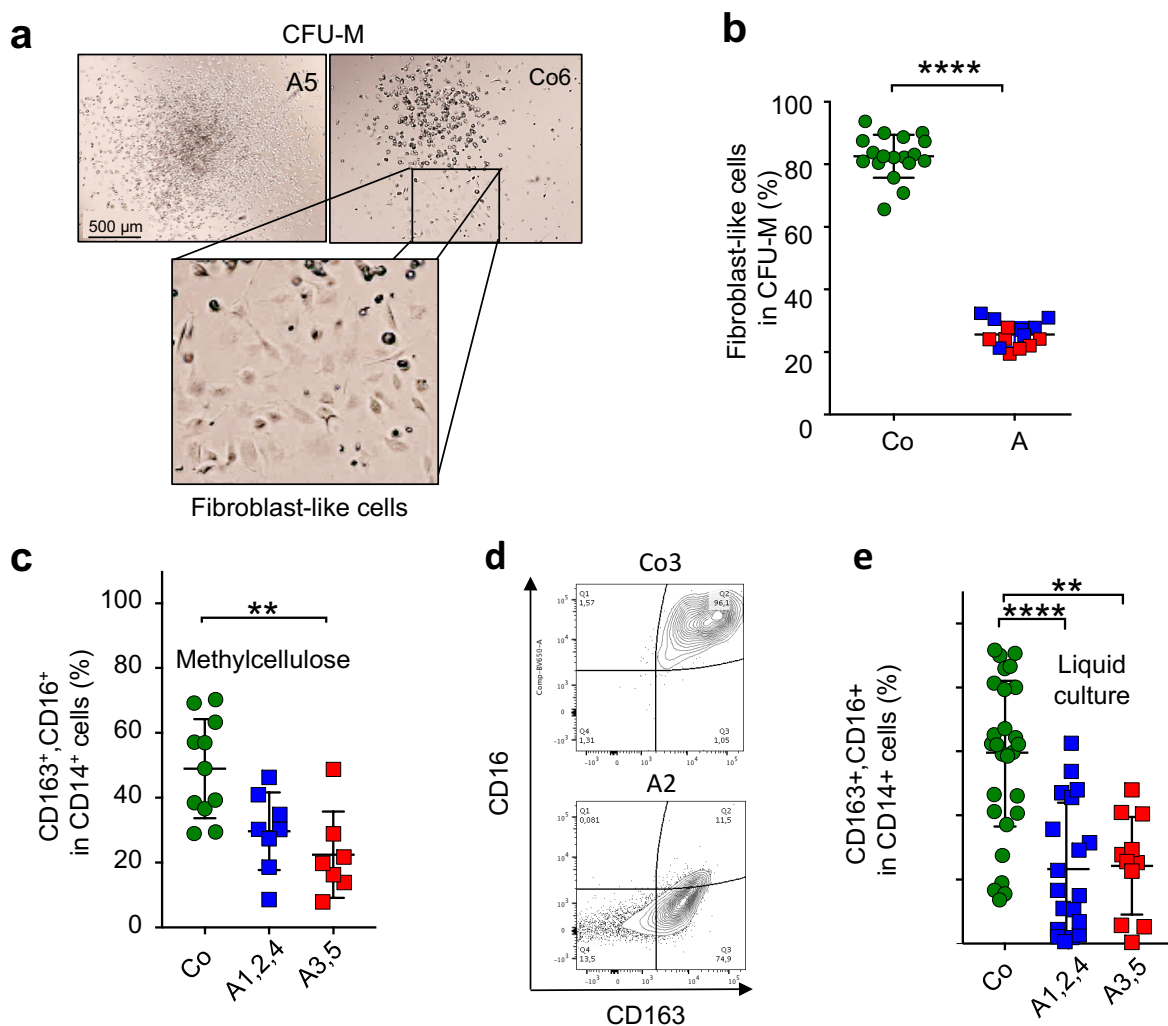


Figure 4: CMML-iPSC derived hematopoietic cells generate dysplastic megakaryocytes. **a.** Healthy donor- and CMML-iPSC derived $CD34^+$, $CD43^+$ hematopoietic cells were sorted and plated in coagulum for 10 days in the presence of 50 ng/ml stem cell factor (SCF) and 10 ng/ml thrombopoietin (TPO) to generate colony-forming unit-megakaryocyte (CFU-Mk); **b.** Total number of colonies generated by plating 1,500 hematopoietic cells derived from indicated iPSCs; **c.** Representative experiments showing the differential morphology of CFU-Mk generated by plating healthy donor- (Co1 clone) or CMML- (A2 clone) iPSC derived hematopoietic cells (scale bar, 100 μm); **d.** Fraction of large colonies, > 50 cells, among the total number of colonies shown on panel c, Kruskal-Wallis test; **e.** Fraction of intermediate colonies, 10-50 cells, among the total number of colonies shown on panel c, Kruskal-Wallis test; **f.** Fraction of $CD41^+$ megakaryocytes generated in liquid culture with all cytokine for 10 days and expressing the cell surface marker CD42, as detected by flow cytometry, Kruskal-Wallis test; **g.** Upper panels show May-Grünwald-Giemsa stained cytopsins of $CD41^+$ cells generated in liquid culture, five days after cell sorting, with a normal (Co3) or dysplastic (A3) morphology. Lower panels: representative images of platelet producing Mk generated by hematopoietic cells derived from indicated clones; scale bars, 50 μm ; **h.** Fraction of platelet-producing Mk in $CD41^+$ cells sorted from liquid culture of $CD34^+$, $CD43^+$ with all cytokines for 10 days, then culture for 6 days with SCF and TPO. Mk = megakaryocytes, Kruskal-Wallis test (Bars indicate mean \pm SD. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$)

Allan Beke et al, Figure 4

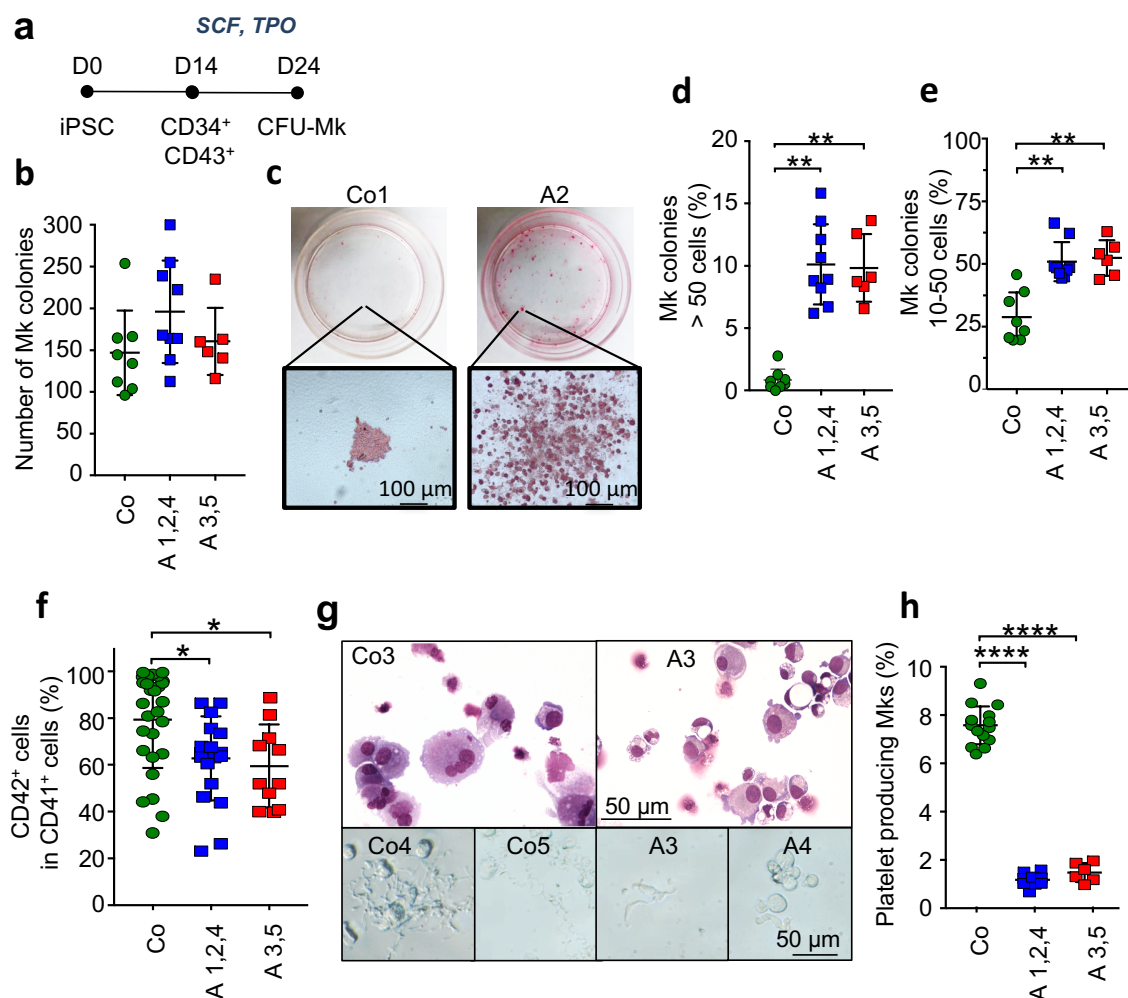


Figure 5. $KRAS^{G12D}$ mutation differentially amplifies the generation of cells of the monocytic lineage. **a.** Healthy donor- and CMML-iPSC derived $CD34^+$, $CD43^+$ hematopoietic cells were sorted and cultured in liquid medium for 10 days in the presence of 50 ng/ml SCF (stem cell factor), 10 ng/ml FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L), 10 ng/ml interleukin-3 (IL-3), 10 ng/ml interleukin-6 (IL-6), 50 ng/ml thrombopoietin (TPO), 1 U/ml erythropoietin (EPO), 10 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), 10 ng/ml granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), 10 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF); **b.** Total number of hematopoietic cells generated by 5,000 $CD34^+$ $CD43^+$ cells cultured in liquid medium for 10 days, Kruskal-Wallis test. **c.** Percentage of viable, DAPI-negative cells measured on day 10 of culture by indicated clones, Kruskal-Wallis test; **d.** Representative flow cytometry analysis of $CD33^+$, $CD14^+$ cells generated in liquid culture by Co3 and A2 clones, respectively, Kruskal-Wallis test; **e.** Fraction of $CD33^+$, $CD14^+$ cells generated in liquid culture by indicated clones, Kruskal-Wallis test; **f.** Fraction of $CD33^+$, $CD14^-$, $CD41^-$ cells generated in liquid culture by indicated clones; **g.** Fraction of $CD123^+$ $CD33^-$, $CD235a^-$, $CD14^-$, $CD41^-$ cells generated in liquid culture by indicated clones, Kruskal-Wallis test; **h.** Fraction of $CD235a^+$, $CD14^-$, $CD41^-$ cells generated in liquid culture by indicated clones, Kruskal-Wallis test. **i.** Fraction of $CD41^+$, $CD14^-$ cells generated in liquid culture by indicated clones; **j.** Radar representation of the differentiation potential of healthy donor- (green) and $KRAS^{wt}$ (blue) CMML- and $KRAS^{G12D}$ (red) CMML-iPSC derived $CD34^+$, $CD43^+$ hematopoietic cells. (Bars indicate mean +/- SD. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$)

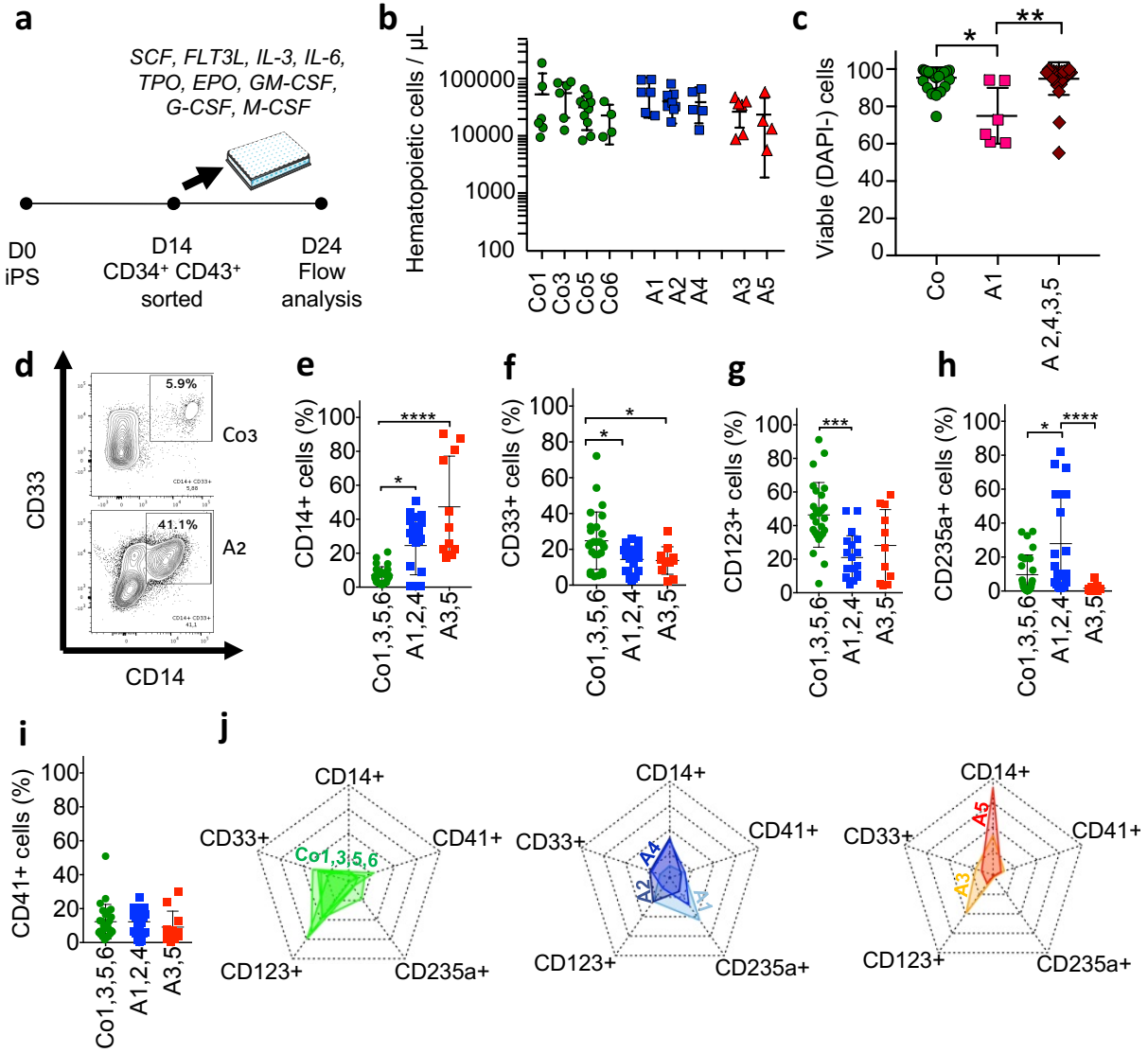


Figure 6. GM-CSF hypersensitivity increases the differentiation of CMML-iPSC derived hematopoietic cells. **a.** Total number of hematopoietic cells generated by culturing 5,000 healthy donor-, *KRAS*^{wt} CMML- and *KRAS*^{G12D} CMML-iPSC derived CD34⁺, CD43⁺ hematopoietic cells in the presence of 50 ng/ml SCF and either increasing concentrations of GM-CSF (from 0 to 10 ng/ml) or 10 ng/ml M-CSF or 10 ng/ml G-CSF or a combination of 10 ng/ml M-CSF and 10 ng/ml GM-CSF for 7 days; **b.** Mean fraction of CD14⁺ cells generated by indicated clones cultured in cytokine conditions described in a, Kruskal-Wallis test; **c.** Mean fraction of CD33⁺ CD14⁻ cells generated by indicated clones cultured in cytokine conditions described in a, Kruskal-Wallis test. (Bars indicate mean +/- SD. *, P<0.05; ** P<0.01; ***, P<0,001 ****, P<0.0001)

Allan Beke et al, Figure 6

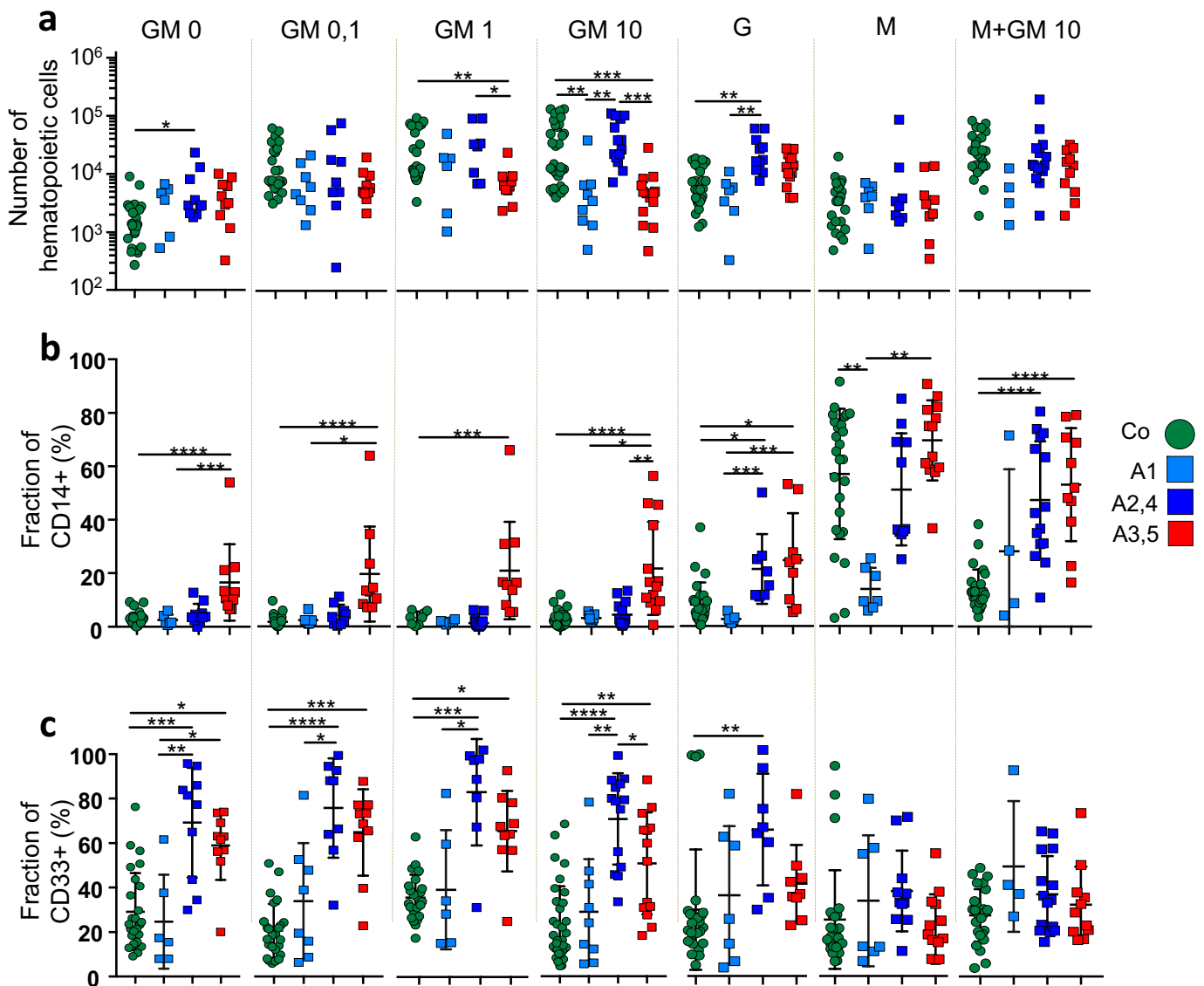


Figure 7. *SRSF2*^{P95H} mutation amplifies the bias of A3 clone towards monocyte lineage differentiation. *SRSF2*^{P95H} was knocked in by gene editing using CRISPR/Cas9 technology in A3 clone (figure S8a, S8b, S8c); **a.** Total number of hematopoietic cells generated by 5,000 A3- or A3P95 (A3S)-derived CD34⁺,CD43⁺ cells seeded in liquid culture with 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml FLT3L, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6, 50 ng/ml TPO, 1 U/ml EPO, 10 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml G-CSF, and 10 ng/ml M-CSF for 10 days, unpaired T test; **b.** Fraction of viable, DAPI-negative cells after 10 days in culture; , unpaired T test; **c.** Fraction of CD14⁺ cells in liquid culture; , unpaired T test; **d.** Fraction of CD123⁺ CD14⁻, CD41⁻,CD235a⁻and CD33⁻ cells after 10 days in culture, unpaired T test; **e.** Total number of colonies or clusters by 5, 000 A3- or A3P95 (A3S)-derived CD34⁺,CD43⁺ cells seeded in methylcellulose in the presence of 50 ng/ml stem cell factor (SCF), 10 ng/ml interleukin-3 (IL-3), 1U/ml erythropoietin (EPO), and 10 ng/ml granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), Mann-Whitney test; **f.** Fraction of clusters, as defined by colonies < 50 cells, among total colonies shown in e, Mann-Whitney test; **g.** Fraction of CFU-GM (colony-forming unit-granulocyte-macrophages among colonies shown in b, Mann-Whitney test; **h.** Fraction CFU-M (colony-forming unit-macrophages) among colonies shown in b, Mann-Whitney test; **i.** Fraction of CFU-G (colony-forming unit-granulocyte) among colonies shown in b, Mann-Whitney test; **j.** Radar summary of the differentiation of A3 and A3P95 (A3S) derived CD34⁺, CD43⁺ cells seeded in liquid culture. (Bars indicate mean +/- SD. *, P<0.05; ** P<0.01; ***, P<0,001 ****, P<0.0001)

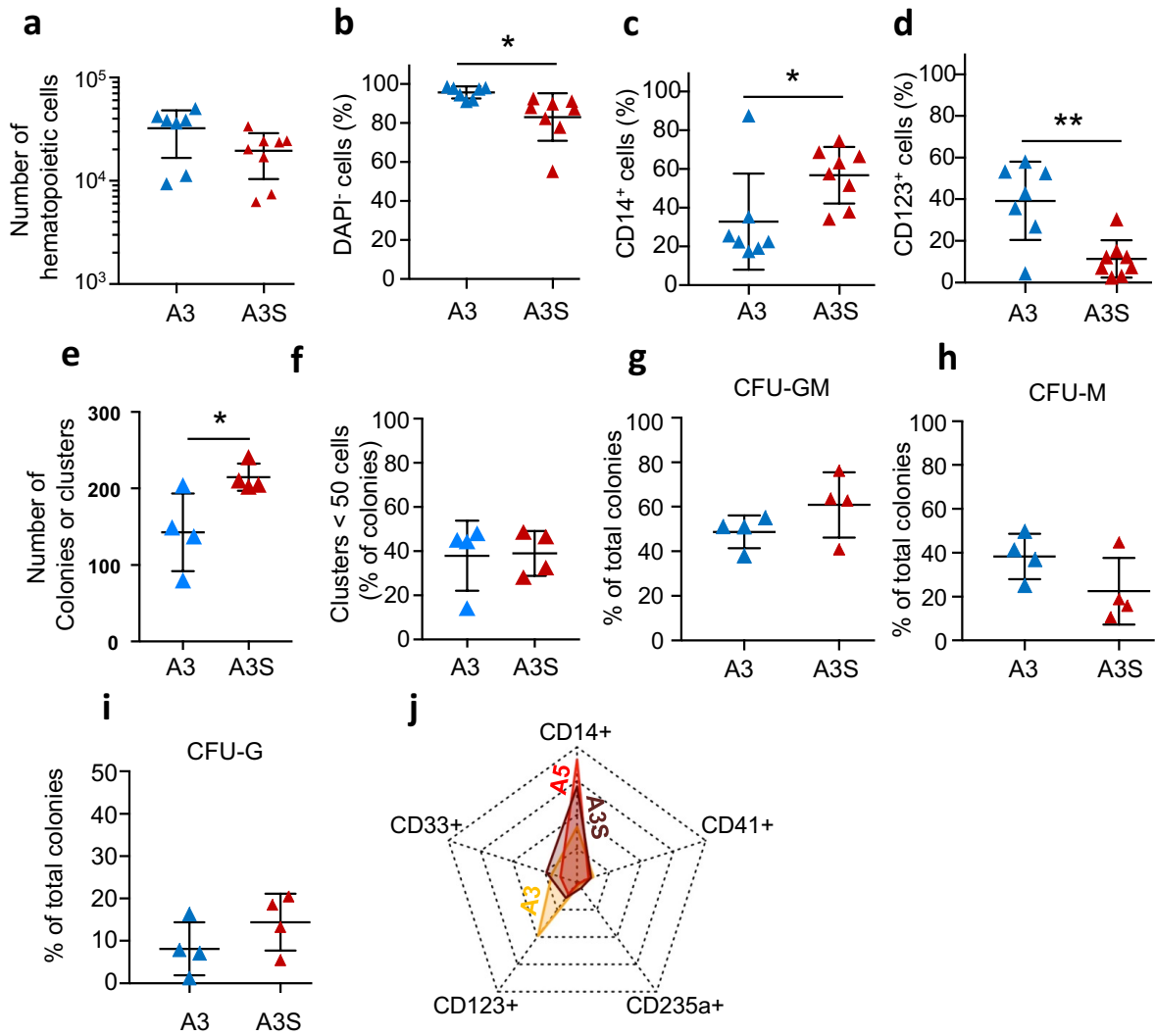
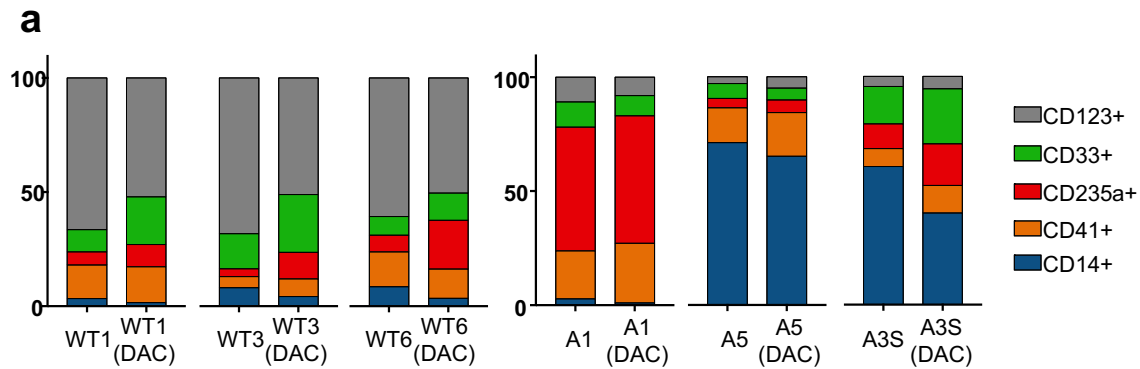


Figure 8. Impact of the demethylating agent decitabine on iPSC differentiation. Healthy donor- (Co1, Co3, Co6) or patient- (A1 and A3S clones) iPSC-derived CD34⁺, CD43⁺ hematopoietic cells were cultured in liquid medium as in Figure 5a, without or with 10 nM decitabine (DAC) for 3 days. After removing the drug, the cells were further cultured in liquid medium for 4 days. **a.** Mean fraction of CD14⁺ (blue), CD41⁺ CD14⁻ (orange), CD235a⁺ CD41⁻ CD14⁻ (red), CD33⁺ CD14⁻ CD41⁻ CD235a⁻ and CD123⁺ CD33⁻ CD14⁻ CD235a⁻ CD41⁻ (grey) at day 7.

Allan Beke et al, Figure 8



Functional heterogeneity exceeds genetic heterogeneity in chronic myelomonocytic leukemia

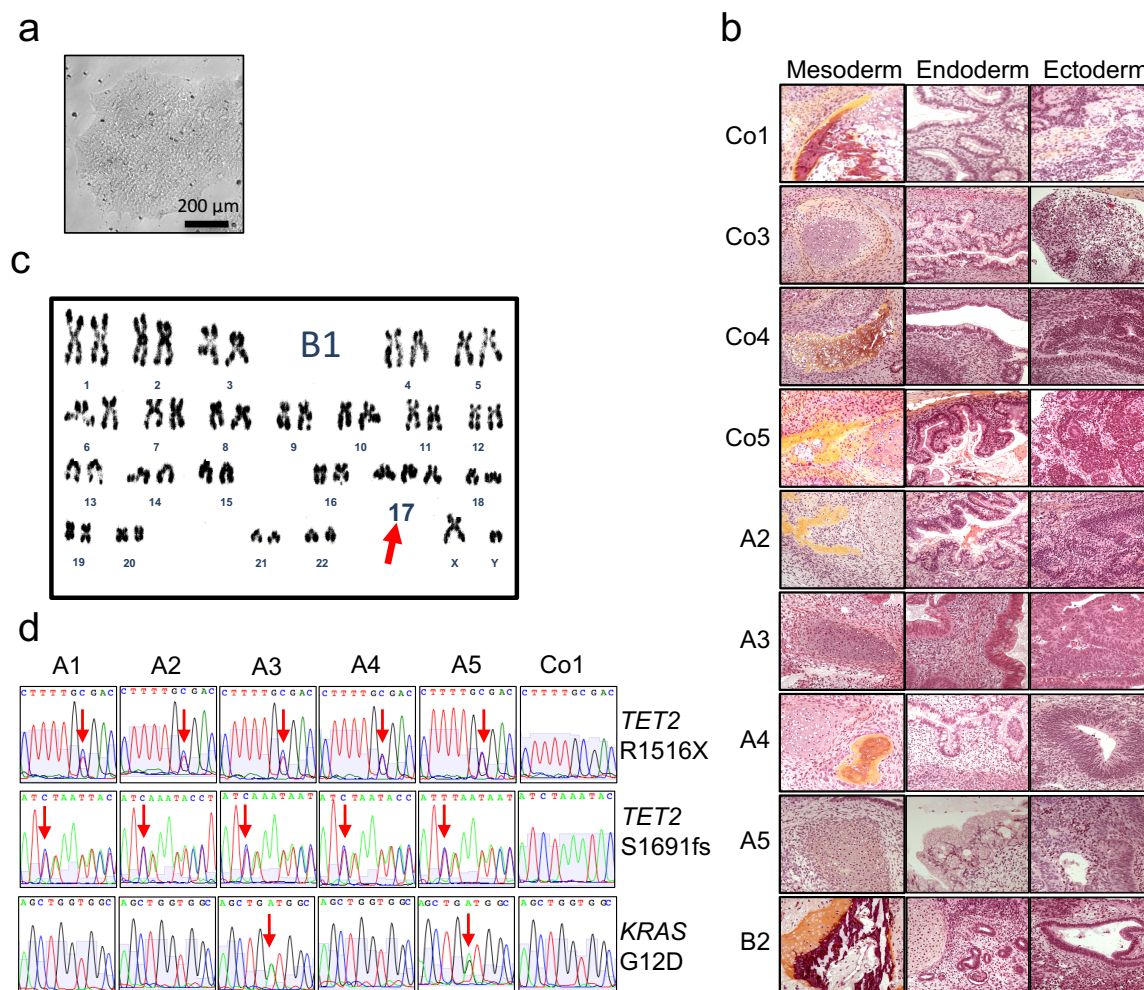
Allan Beke,^{1,2} Julie Rivière,¹ Lucie Laplane,^{1,3} Miguel Torres-Martin,⁴ Véronique Saada,⁵ Ana Hurtado,⁶ Philippe Rameau,⁷ Larissa Lordier,⁷ Cyriane Oeuvray,⁷ Vincent Ribrag,⁸ William Vainchenker,¹ Maria Figueroa,⁴ Nathalie Droin,^{1,2} Éric Solary^{1,2,8}

SUPPLEMENTAL MATERIAL



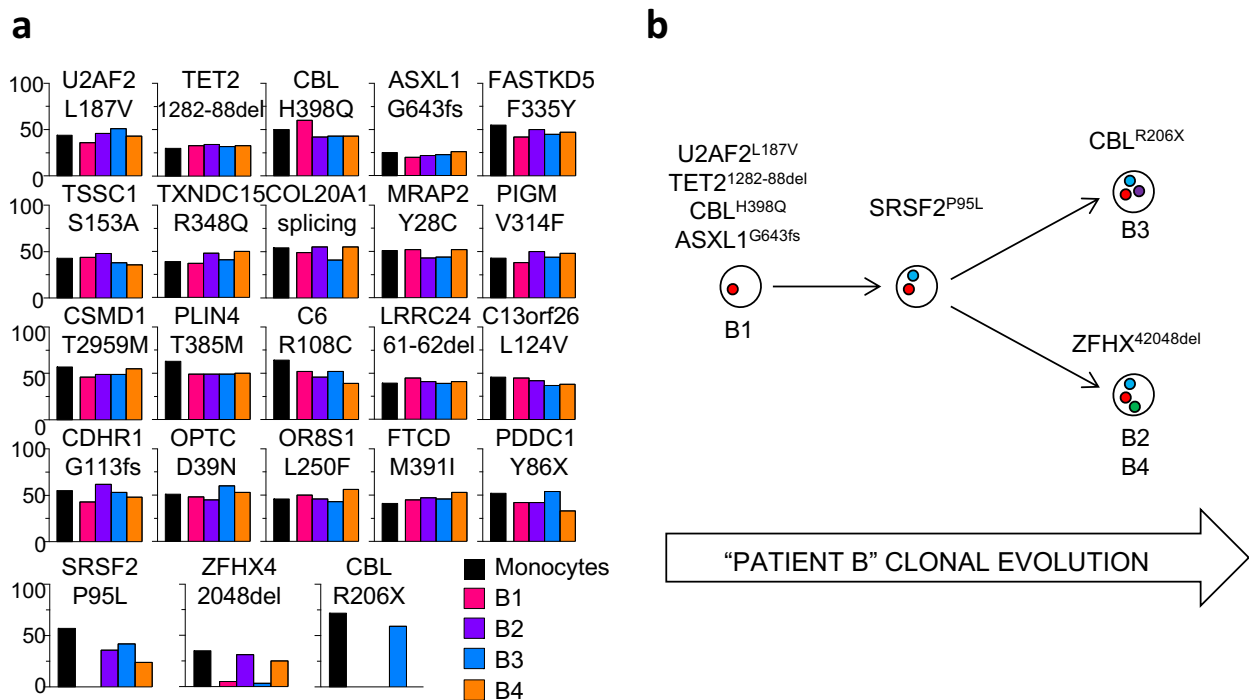
Supplemental Figure 1. Characterization of induced pluripotent stem cells. **a.** Light microscopy visualization of an iPSC (clone A4) is shown. Scale bar 200 μm ; **b.** H&E staining of teratomas developed in NSG mice injected subcutaneously with indicated clones, showing mesoderm, including bone and cartilage (Co1, Co4, Co5, A2, A4) or cartilage alone (Co3, A3, A5, B2), endoderm, including intestinal-like mucin-secreting cells in every clone but B2 (renal glomerus), and ectoderm, showing neural tubes in every clone but Co3 (glial nodule). **c.** Cytogenetic analysis of iPSCs generated by reprogramming patient B CD34-positive cells showing a trisomy 17 (red arrow) in clone B1 (shown here) as well as clone B3 and B4 (not shown); **d.** Sanger sequencing of *TET2* and *KRAS* genes, showing *TET2*^{R1516X} and *TET2*^{S1691fs} mutations in every clone A and a *KRAS*^{G12D} mutation in only two of them (A3 and A5).

Allan Beke et al, Supplemental Figure 1.



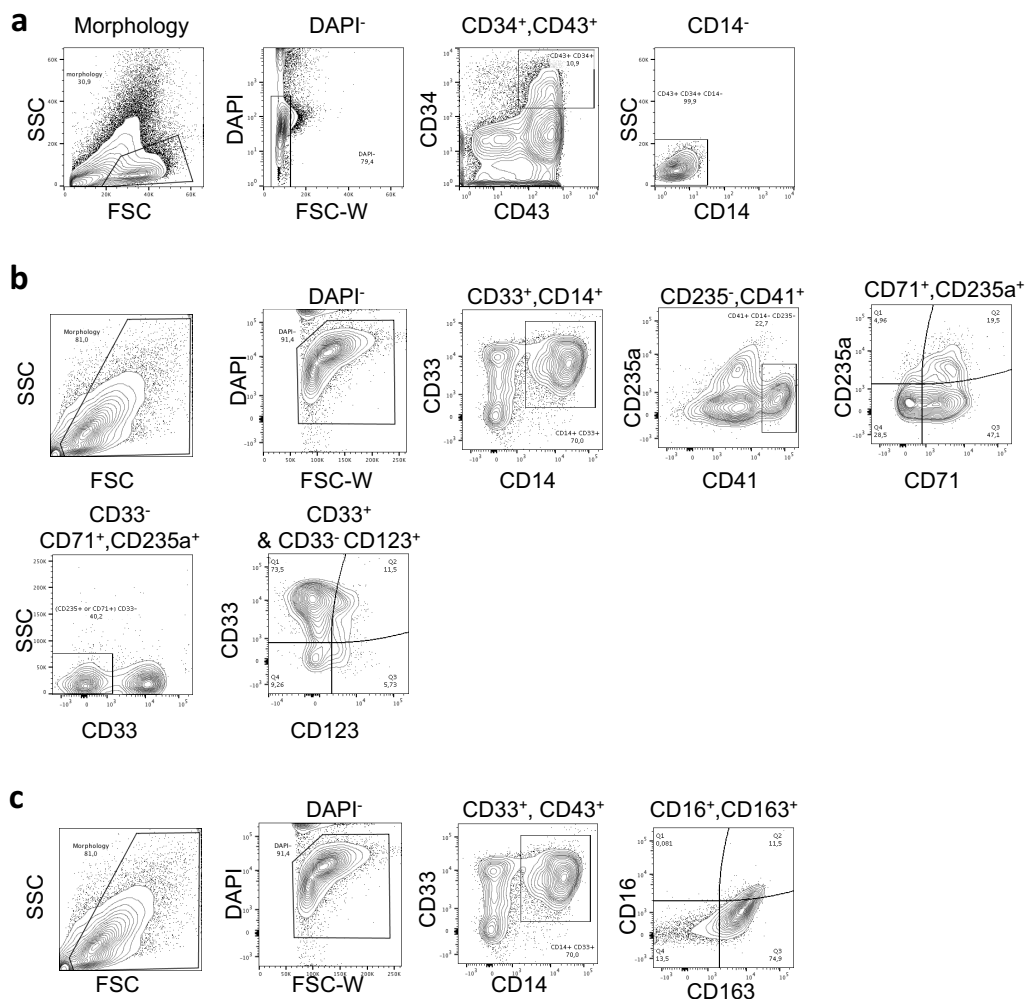
Supplemental Figure 2. Characterization of induced pluripotent stem cells established from patient B. **a.** Whole exome sequencing of DNA collect from peripheral blood monocytes (Patient B) and the 4 iPS clones established by reprogramming patient B CD34-positive cells, showing the detection of 20 common somatic variants and three genotypes defined by three distinctive variants. Each color indicates a specific clone; **b.** Schematic representation of clonal heterogeneity captured by CD34-positive cell reprogramming.

Allan Beke et al, Supplemental Figure 2.



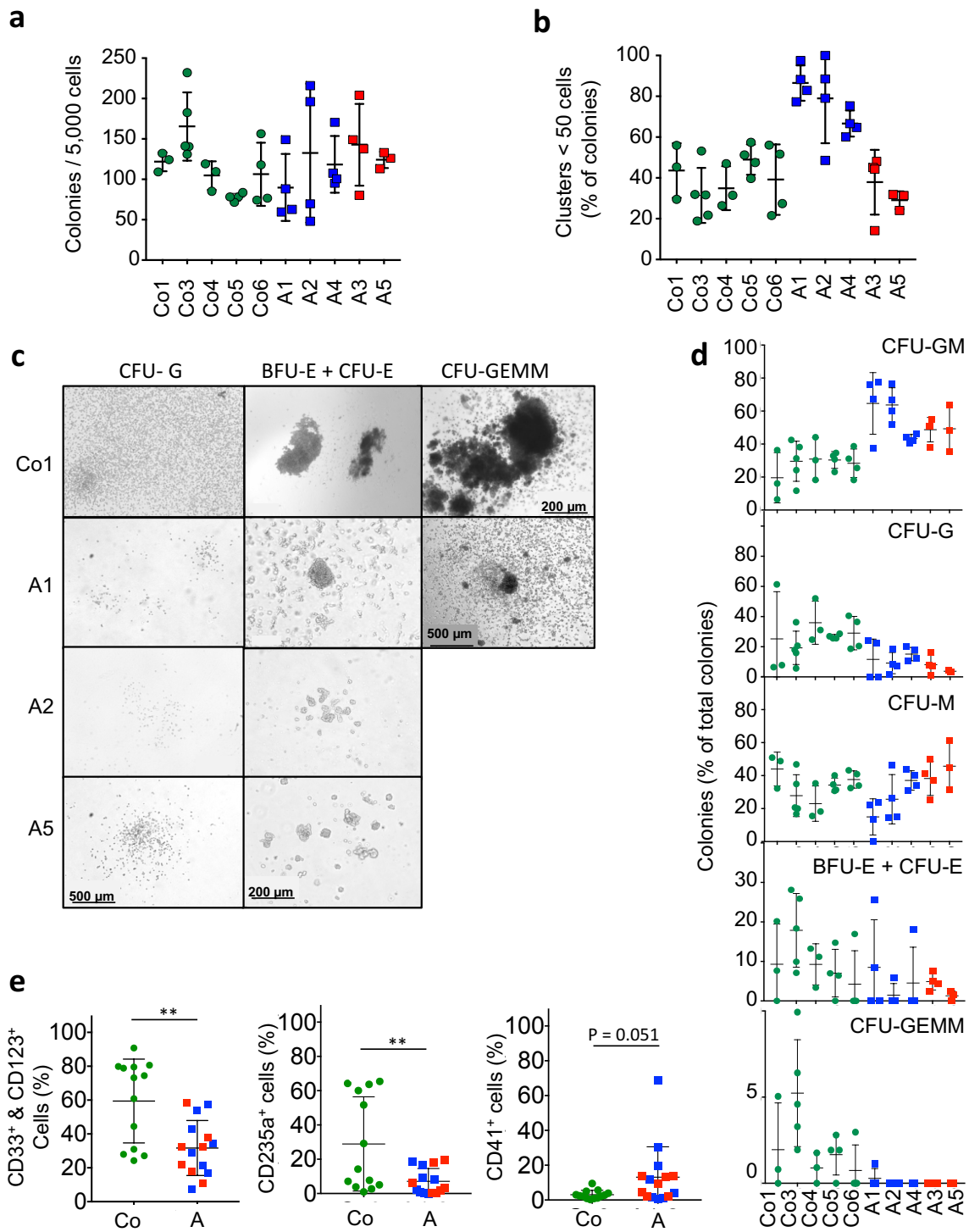
Supplemental Figure 3: Flow cytometry analysis and sorting of hematopoietic cells generated by iPSC differentiation. **a.** Gating strategy used to identify hematopoietic stem and progenitor cells generated by differentiation of iPSCs; After labeling with antibodies targeting CD14, CD34, and CD43 and with DAPI, hematopoietic cells were roughly selected on morphological parameters before excluding DAPI- doublets using FSC-width and selecting CD34⁺ CD43⁺ cells, of which only CD14-negative cells were sorted in a sterile tube with 0.5 ml of medium. **b.** Gating strategy used to identify differentiated hematopoietic cells after labeling with 12 antibodies targeting CD11b, CD13, CD14, CD16, CD33, CD34, CD41, CD42, CD71, CD123, CD163 and CD235a and with DAPI. Hematopoietic cells were initially selected on morphological parameters before excluding DAPI-labeled cells. Cells of the monocytic lineage, which expressed CD33 and CD14, were counted and excluded from subsequent analyses. Cells of the megakaryocytic lineage expressing CD41 but not CD235a were counted and excluded from subsequent analysis. Cells of the erythroid lineage were identified as those expressing CD235a or CD71 but not CD33, counted, and excluded from subsequent analysis. The remaining cells expressing CD33 were considered as granulocytes whereas those expressing CD123 were counted as myeloid progenitors. **c.** Gating strategy to identify CD16⁺, CD163⁺ macrophages in the CD14⁺ cell population. Hematopoietic cells were labeled with antibodies targeting CD14, CD16, CD33, and CD163 and stained with DAPI. Hematopoietic cells were selected on morphological parameters, DAPI-labeled cells were excluded, and cells of the monocyte lineage expressing both CD33 and CD14 were selected. These cells were separated in four subsets based on CD16 and CD163 expression, namely CD16⁻ CD163⁻, CD16⁺ CD163⁻, CD16⁻ CD163⁺ and CD16⁺ CD163⁺ cells.

Allan Beke et al, Supplemental Figure 3



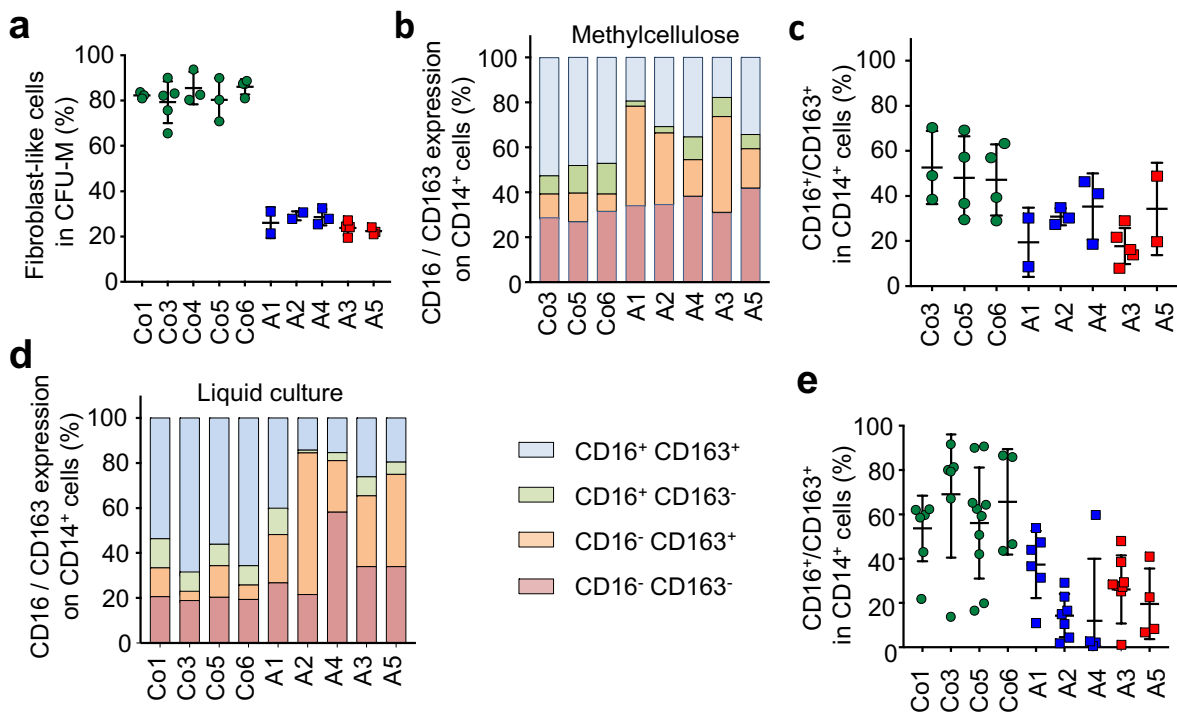
Supplemental figure 4. Hematopoietic cells derived from CMML patient are biased toward the monocyte lineage. Details of results shown on Figure 2 are depicted. **a.** Total number of colonies generated by plating 5,000 iPSC-derived CD34⁺, CD43⁺ hematopoietic cells in methylcellulose for 14 days, Kruskal-Wallis test; **b.** Fraction of clusters, as defined by colonies < 50 cells, among colonies, Kruskal-Wallis test; **c.** Representative CFU-G (colony-forming unit-granulocyte), erythroid colonies (CFU-E: colony-forming unit-erythroid and BFU-E: burst-forming unit-erythroid) and CFU-GEMM (colony-forming unit-granulocyte-erythroid-monocyte-megakaryocyte) generated by indicated iPSC clones and visualized by light microscopy. Scale bars indicate magnification, Kruskal-Wallis test; **d.** Fraction of indicated colonies among colonies shown in b. **e.** Fractions of CD33⁺ or CD123⁺, CD14⁻, CD41⁻, CD235a⁻ cells (upper panel), CD235a⁺, CD41⁻, CD14⁻ cells (middle panel) and CD41⁺, CD14⁻ cells (lower panel) in cells collected from colonies grown in methylcellulose from healthy donor- (Co3, Co5, Co6) or CMML patient- (A1, A2, A3, A4, A5) iPSC-derived hematopoietic cells, unpaired T test. (Bars indicate mean +/- SD. *, P<0.05; ** P<0.01; ***, P<0,001 ****, P<0.0001)

Allan Beke et al, Supplemental Figure 4



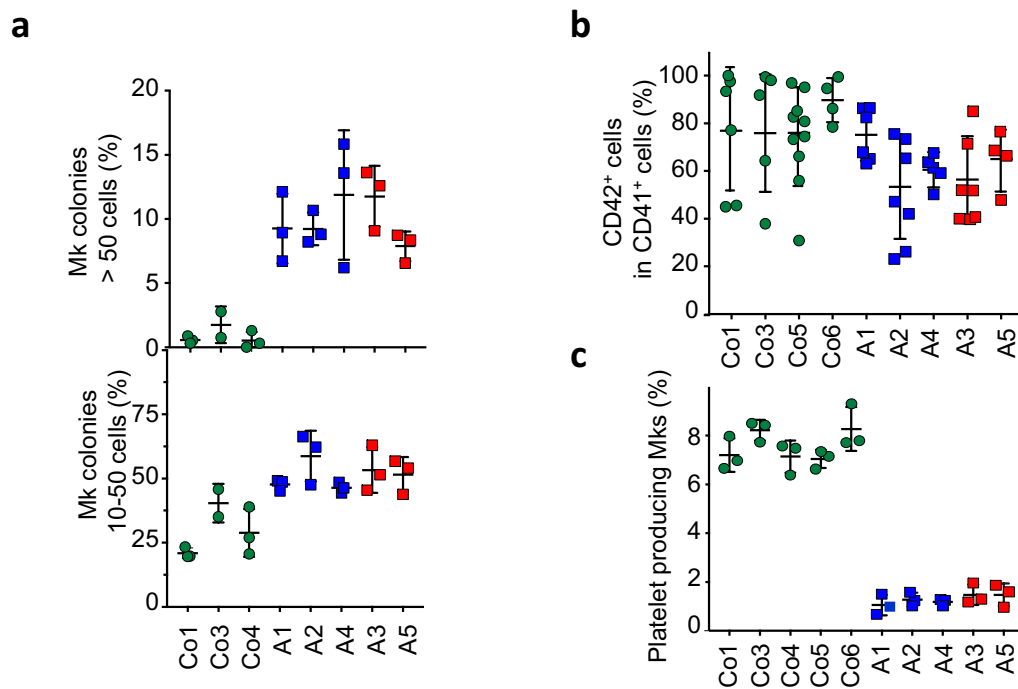
Supplemental Figure 5. Defective maturation of CMML-iPSC derived hematopoietic cells into macrophages. Details of results shown on Figure 3 are depicted. **a.** Fraction of cells with a fibroblast-like shape in CFU-M derived from five healthy donor-(Co1, Co3, Co4, Co5, Co6) and five CMML (A1 to A5) iPSC-derived hematopoietic cells; Kruskal-Wallis test **b,c,d,e.** Flow cytometry analysis of CD16 and CD163 expression at the surface of CD14⁺ cells collected from indicated iPSC-derived hematopoietic cells cultured in methylcellulose (**b,c**) or in liquid medium (**d,e**). Green dots, healthy donor derived clones; Blue squares, *KRAS* wildtype CMML-derived clones; Red squares, *KRAS*^{G12D} CMML-derived clones, Kruskal-Wallis tests (Bars indicate mean +/- SD. *, P<0.05; ** P<0.01; ***, P<0,001 ****, P<0.0001)

Allan Beke et al, Supplemental Figure 5



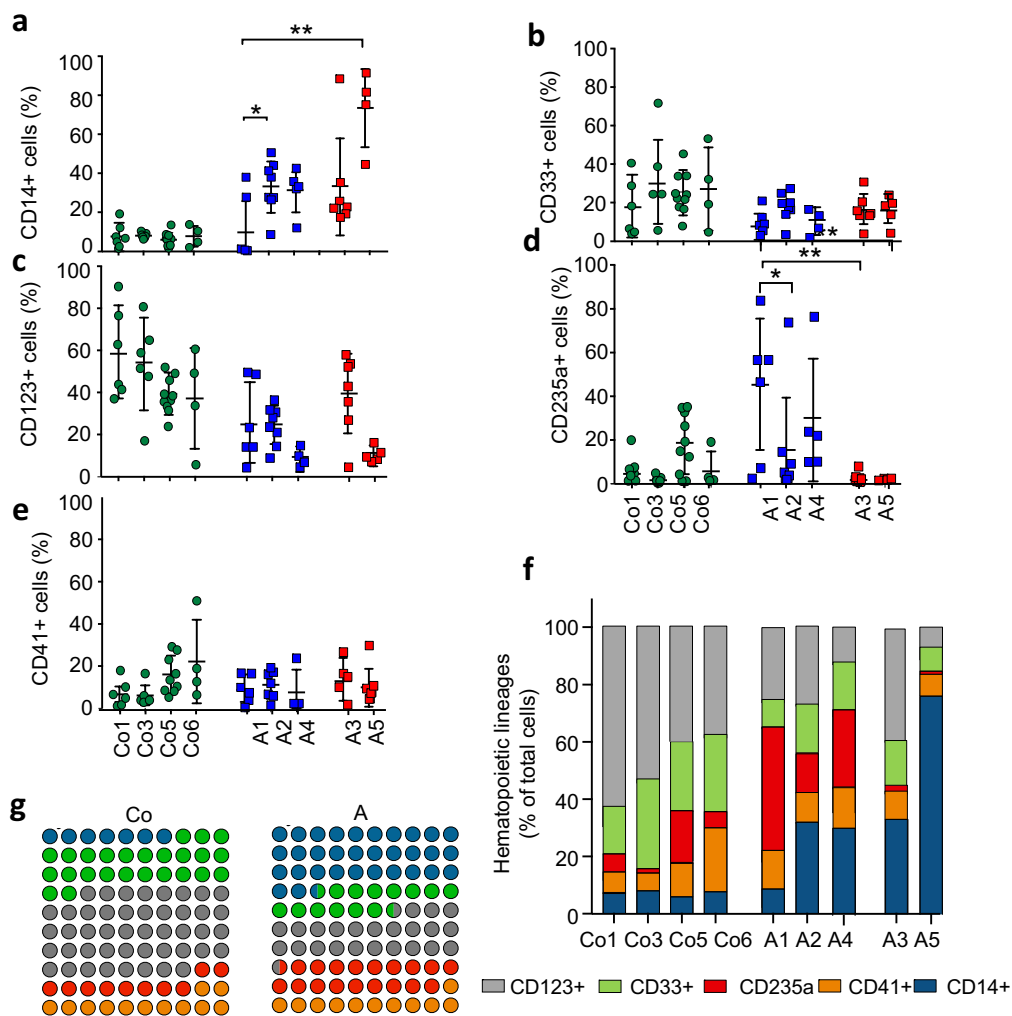
Supplemental Figure 6. CMML-iPSC derived hematopoietic cells generate dysplastic megakaryocytes. Details of results shown on Figure 4 are depicted. **a.** Fraction of large Mk colonies, > 50 cells (upper panel), and intermediate colonies, 10-50 cells (lower panel), among Mk colonies generated by indicated iPS clones; Kruskal-Wallis tests **b.** Flow cytometry analysis of the fraction of CD41⁺ Mk expressing the cell surface marker after 10 days in liquid culture with all cytokines; Kruskal-Wallis test **c.** Platelet-producing Mk in CD41⁺ cells sorted from liquid culture of CD34⁺,CD43⁺ with all cytokines for 10 days, then culture for 6 days with SCF and TPO; Kruskal-Wallis test (Bars indicate mean +/- SD. *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0,001 ****, P<0.0001)

Allan Beke *et al*, supplemental Figure 6



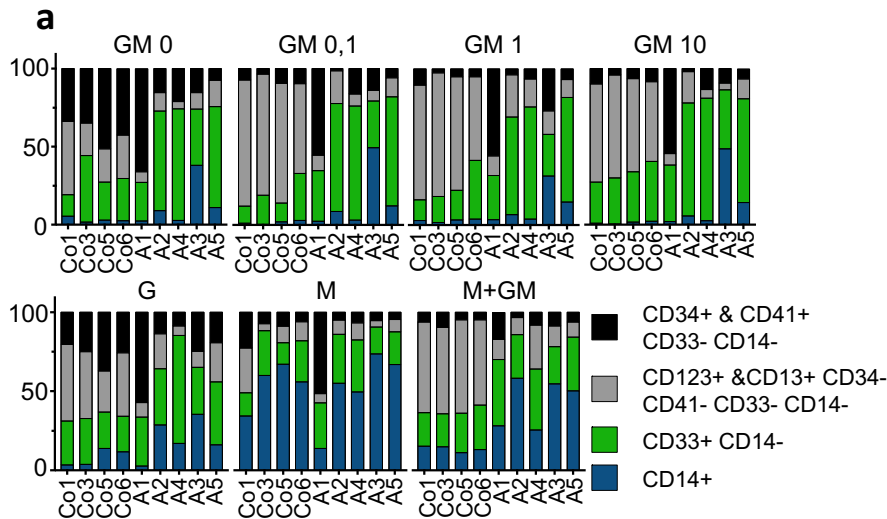
Supplemental figure 7. KRAS^{G12D} mutation differentially amplifies the generation of cells of the monocytic lineage. Details of results shown on Figure 5 are shown. Healthy donor- and CMML-iPSC derived CD34⁺, CD43⁺ hematopoietic cells were cultured in liquid medium for 10 days as described on Figure 5; Kruskal-Wallis test; **a.** Fraction of CD33⁺,CD14⁺ cells generated in liquid culture by indicated clones; Kruskal-Wallis test; **b.** Fraction of CD123⁺ CD33⁻,CD235a⁻,CD14⁻,CD41⁻ cells generated in liquid culture by indicated clones; Kruskal-Wallis test; **c.** Fraction of CD235a⁺,CD14⁻,CD41⁻ cells generated in liquid culture by indicated clones; Kruskal-Wallis test; **d.** Fraction of CD33⁺,CD14⁻,CD41⁻ cells generated in liquid culture by indicated clones; Kruskal-Wallis test; **e.** Fraction of CD41⁺, CD14⁻ cells generated in liquid culture by indicated clones; **f.** Summary of the cells generated in liquid culture by indicated clones; **g.** Summary of the cells generated by healthy donor- and CMML-iPSC derived CD34⁺, CD43⁺ hematopoietic cells. (Bars indicate mean +/- SD. *, P<0.05; ** P<0.01; ***, P<0,001 ****, P<0.0001)

Allan Beke et al, Supplemental Figure 7



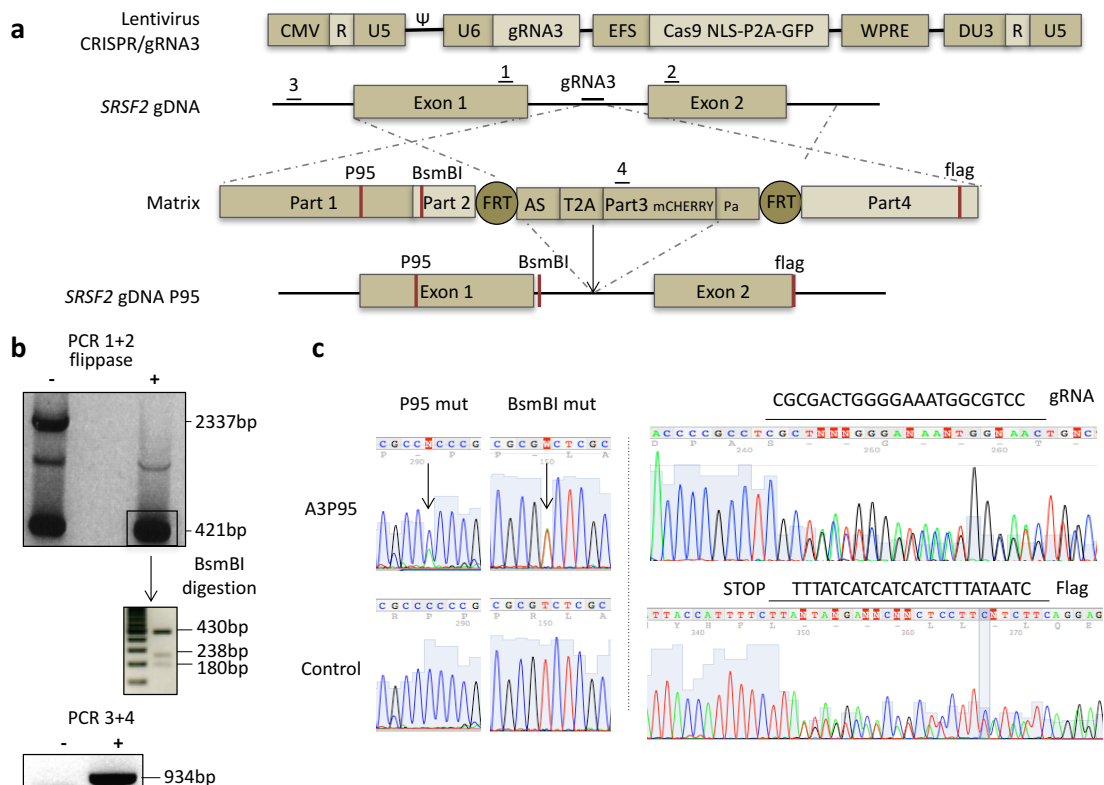
Supplemental figure 8. GM-CSF hypersensitivity increases the differentiation of CMML-iPSC derived hematopoietic cells. a. Mean fraction of CD34⁺ or CD41⁺ CD33⁻ CD14⁻ cells (black), CD123⁺ or CD13⁺, CD34⁻, CD41⁻, CD33⁻, CD41⁻ cells (grey), CD33⁺, CD14⁻ cells (green) and CD14⁺ cells (blue) generated by indicated clones cultured in cytokine conditions described in figure 6.

Allan Beke et al, supplemental figure 8



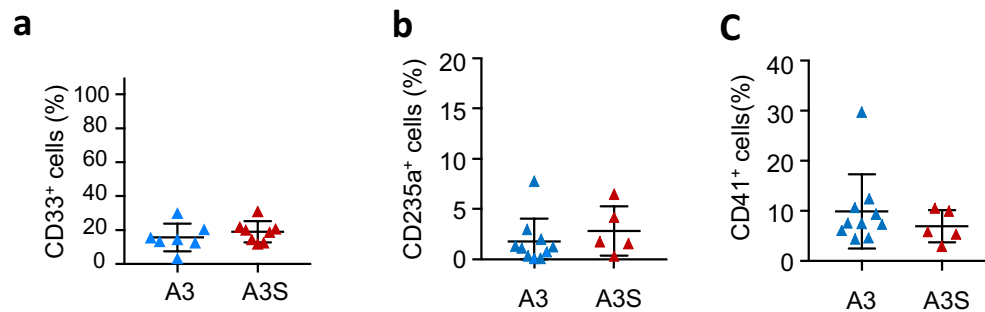
Supplemental Figure 9. CRISPR/Cas9-induced homologous recombination to introduce SRSF2^{P95H} mutation in IPS clones. **a.** Schematic representation of the vector constructed from the LentiCRISPR-V2puro (addgene#52961) to co-express *Streptococcus pyogenes* Cas9 linked to the Green Fluorescence Protein (GFP) sequence by a P2A peptide driven by *Elongation Factor 1 Short (EFS)* promoter and SRSF2 intron targeting gRNA3 (selected for efficacy by deep sequencing) driven by the U6 promoter; **b.** The homologous recombination template was delivered using a lentiCRISPR backbone in which the expression cassette was replaced by a mutiple cloning site containing a BsmBI restriction site. The matrix was generated using a « BsmBI golden gate » cloning strategy to associate five fragments: part 1, part 2 and part 4 were amplified from human genomic DNA and site-directed mutagenesis was used to introduce P95 mutation in part 1, a silent mutation generating a BsmBI site in part 2, and a flag sequence in part 4, respectively, before cloning the fragments into pCR-TOPO plasmid for sequence verification. The left homology (part1 + part2) was 758bp long, the right homology (part4) was 795bp long. Part 3 was an excisable mCherry cassette with two flippase recognition target (FRT) sites (1934bp) allowing us to sort mCherry-expressing cells before removing the cassette with a flippase. Part 5 corresponds to the lentiCRISPR backbone. **c.** Each step of the homologous recombination process was controlled by specific PCR on clone A3^{P95} genomic DNA. PCR 3+4 amplified a 934bp band indicating the specific insertion as the primer 3 is outside the recombination matrix. PCR 1+2 amplified a 2337bp band (indicating HR of one allele) and a 421bp band (wildtype sequence of the other allele). After flippase activation, PCR 1+2 combined with BsmBI digestion identified the 430 bp mutated allele and the digested WT allele (238+180bp): **d.** Sanger sequencing showing that the A3^{P95} clone is heterozygote for P95, BsmBI, the flag insertion and the gRNA location where the cut take place. PCRs were performed using primer P95-fwd/P95-rev, 1/2 and FLAG-fwd/FLAG-rev and sequenced with primer 1, P95-fwd and FLAG-fwd (see table) then analysed on 4-Peaks (WPRE : Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element; AS : Acceptor Site; Pa : Poly adenylation signal ; Ψ : Psi, encapsidation signal ; 1, 2, 3, 4: primer location).

Allan Beke et al, supplemental figure 9



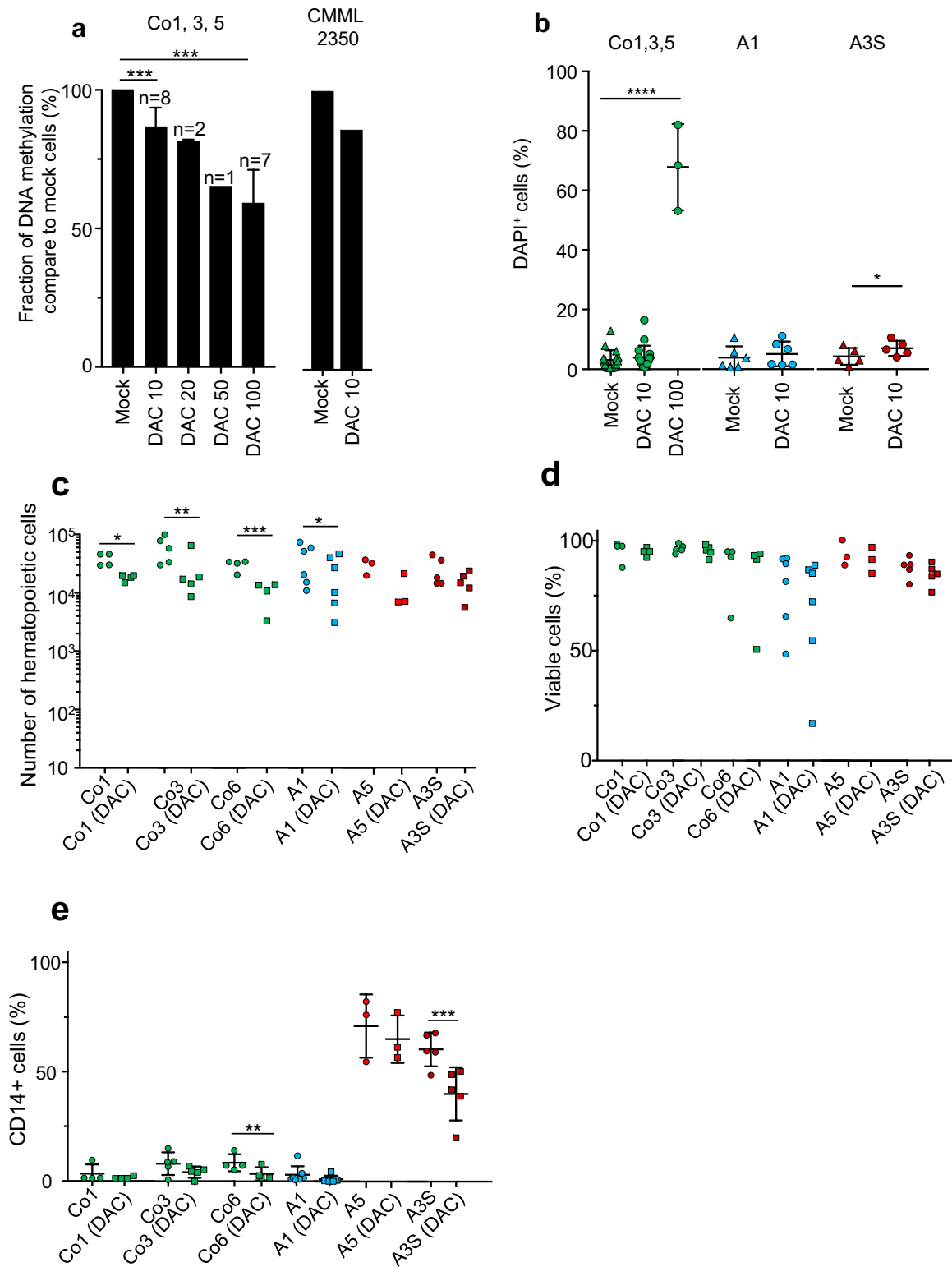
Supplemental Figure 10. SRSF2^{P95H} mutation amplifies the bias of A3 clone towards monocyte lineage differentiation. A3- and A3S-derived CD34⁺, CD43⁺ cells were seeded in methylcellulose for 14 days in the presence of 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml GM-CSF, and 1 U/ml EPO before collecting the cells forming colonies and analyzing these cells by flow cytometry to measure the fraction of CD33⁺ (a), CD235a⁺ (b) and CD41⁺ (c) cells. A summary is shown on panel; unpaired T tests. (Bars indicate mean +/- SD. *, P<0.05; ** P<0.01; ***, P<0,001 ****, P<0.0001)

Allan Beke et al, Supplemental Figure 10



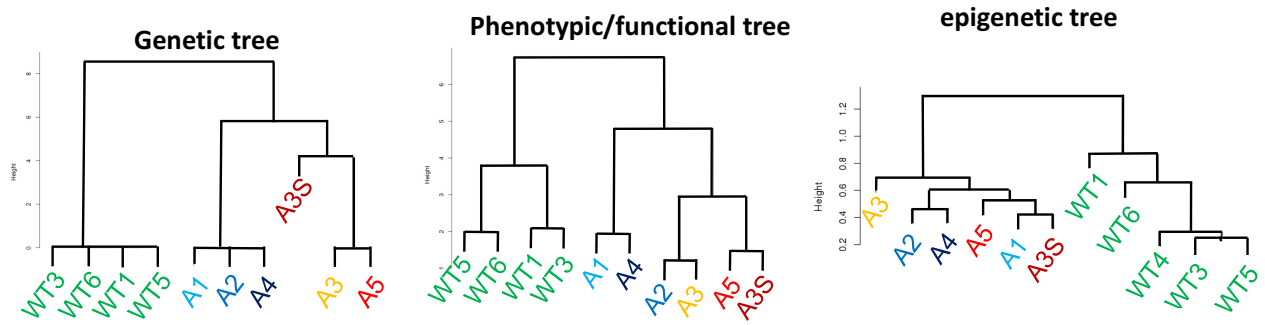
Supplemental figure 11. DNA demethylating effect of decitabine on cultured cells. **a.** iPSC-derived CD34⁺, CD43⁺ hematopoietic cells or CMMML peripheral blood monocytes were cultured for 3 days in the presence of indicated concentration of decitabine (DAC) before measuring the fraction of methylated using an ELISA that measures the methylation level of LINE1 sequences; unpaired T tests; **b.** Fraction of dead cells after 3 days of treatment with DAC 10 nM; unpaired T tests. (Bars indicate mean +/- SD. *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001 ****, P<0.0001).

Allan Beke et al, Supplemental Figure 11



Supplemental figure 12. Illustration of the clonal heterogeneity. Ascending Hierarchical Classification (AHC) relied on (left to right) the genetic, the liquid hematopoietic differentiation and the epigenetic (eRRBS).

Allan Beke *et al.*, Supplemental figure 12



Chapitre III : *discussion*

Le travail réalisé au cours de cette thèse a permis de montrer que la reprogrammation de cellules CD34⁺ issues de patients atteints de LMMC permet de capturer une partie de l'hétérogénéité génétique du clone leucémique. L'analyse comparative des clones de cellules reprogrammées révèle des degrés d'hétérogénéité supplémentaires, épigénétiques et fonctionnels. Si cette hétérogénéité multi-niveaux n'est pas générée par la reprogrammation et reflète fidèlement la structure du clone leucémique chez les patients, elle devrait singulièrement compliquer l'éradication de la maladie. Ces observations suggèrent un certain nombre de questions et ouvrent la porte à de nouvelles investigations.

Les mutations du gène *TET2* n'interdisent pas la reprogrammation des cellules hématopoïétiques

L'une des questions que nous nous posons au début de ce travail était l'impact des mutations de *TET2* sur la reprogrammation des cellules CD34⁺ des patients atteints de LMMC.

Les gènes *TET* (*Ten-Eleven Translocation*) ont été identifiés comme partenaires du gène *MLL* dans des réarrangements chromosomiques détectés dans des cellules de leucémie aiguë myéloïde. Les 3 protéines TET (TET1, 2 et 3) sont des ADN hydroxylases qui catalysent l'oxydation des méthylcytosines en 5-hydroxyméthylcytosines et celle de ses dérivés dans les cellules de mammifères, une étape du processus de déméthylation (Ito et al. 2011). Cette activité enzymatique implique une région conservée en région C-terminale de ces protéines (figure 30). La méthylation/déméthylation des cytosines de l'ADN est une modification épigénétique d'importance majeure, impliqué dans l'inactivation du chromosome X, l'empreinte parentale, la régulation de l'expression des gènes au cours du développement et de la différenciation cellulaire, et leur dérégulation dans des circonstances pathologiques. Les protéines de la famille TET ont d'autres fonctions. Ces protéines, en particulier TET2, interagissent avec l'enzyme OGT (O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase) (Chen et al. 2013; Deplus et al. 2013) une enzyme qui catalyse le transfert d'une molécule d'O-GlcNAc sur des résidus sérine/thréonine de certaines de protéines dont les histones pour réguler la transduction du signal et la transcription des gènes. En outre, TET2 régule l'expression des gènes spécifiques, par exemple en recrutant l'histone déacétylase HDAC2 sur le promoteur de gènes codant des cytokines dans les macrophages, plus particulièrement les gènes codant l'IL-6 (Q. Zhang et al. 2015) et le macrophage inhibitory factor (N Droin, résultats non publiés).

Les protéines TET régulent la méthylation de gènes de pluripotence (Williams et al. 2011; H. Wu et al. 2011). Un rôle essentiel de TET1 a été décrit initialement dans la maintenance du



caractère pluripotent des cellules souches embryonnaires murines (H. Wu et al. 2011) et la mise en place de contextes chromatinien associés à la pluripotence (Szulwach et al. 2011). TET1 (Costa et al. 2013) et TET2 (Doege et al. 2012) interagissent avec NANOG, un facteur de maintenance du caractère pluripotent, et la surexpression de NANOG et de TET1 et TET2 augmente l'efficacité de reprogrammation, NANOG guidant le recrutement des enzymes TET au niveau de loci spécifiques de l'ADN. En outre, TET2 interagit avec la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) pour réguler l'expression de *NANOG* et d'autres gènes de pluripotence à la phase précoce de la reprogrammation (Doege et al. 2012). TET1 pourrait remplacer OCT4 pour générer des iPSCs en induisant la déméthylation du promoteur endogène d'*OCT4* (Gao et al. 2013). Enfin, l'interaction des enzymes TET avec l'histone déacétylase Sirtuin 6 (SIRT6) régulerait la balance entre pluripotence et différenciation (Etchegaray et al. 2015). Tous ces travaux suggèrent un rôle des protéines de la famille TET à différents stades de la reprogrammation des cellules somatiques et dans la maintenance des cellules reprogrammées (P. Wang et al. 2013). Ils posaient la question de savoir si les mutations de *TET2* allaient bloquer la reprogrammation des cellules CD34-positives des patients atteints de LMMC.

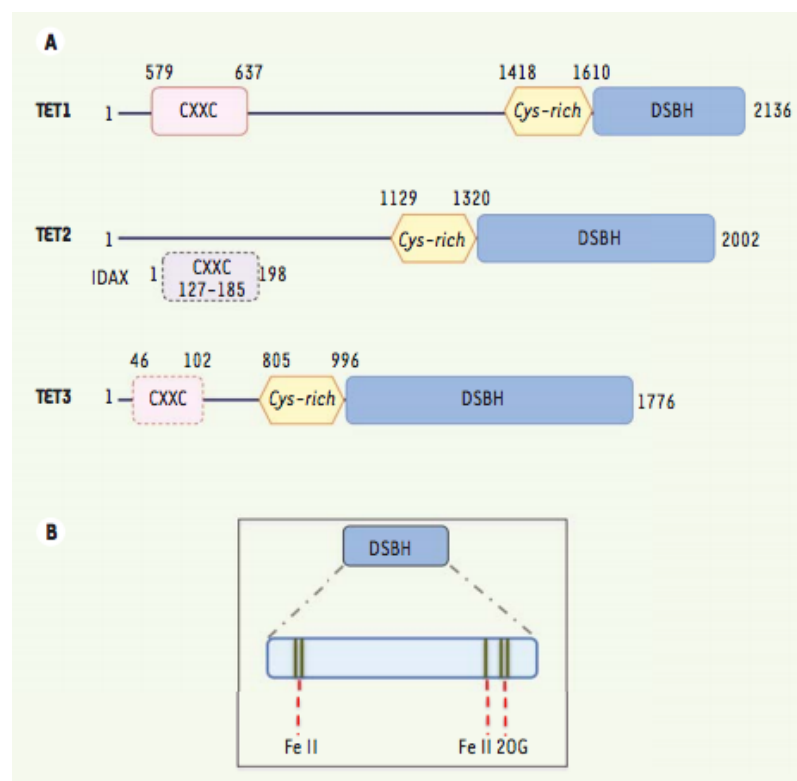


Figure 30 : Représentation schématique des protéines TET.

Les trois membres de la famille TET partagent une région carboxy-terminale hautement conservée au cours de l'évolution. Cette région comprend un domaine riche en cystéines suivi d'une séquence en double hélice avec feuillet E (DSBH) qui est le domaine catalytique de ces protéines. TET1 et TET3 présentent, à leur extrémité aminoterminal, un domaine de liaison à la chromatine (CXXC), alors que TET2 en est démunie ; mais TET2 agit en partenariat avec IDAX (CXXC4, une protéine à domaine CXXC). B. Le domaine DSBH des protéines TET comprend deux sites de fixation au Fe II et un site de liaison au 2-oxoglutarate (2OG) (Mahfoudhi et al. 2015)

L'activation des gènes endogènes de pluripotence impose leur déméthylation. Les protéines TET ont été impliquées dans la reprogrammation par leur capacité à induire l'hydroxyméthylation des méthylcytosines et d'activer les gènes de pluripotence comme Nanog, Essrb et Oct 4 (Bagci and Fisher 2013). La question s'est posée de savoir si les enzymes TET étaient indispensables à la reprogrammation des cellules somatiques, si elles participaient à la déméthylation des loci de pluripotence, et si elles étaient redondantes dans cette fonction. Une équipe a montré en 2014 (X. Hu et al. 2014) que la délétion des 3 gènes *TET* (*TET1*, *TET2*, *TET3*) n'avait aucun impact sur la morphologie des cellules souches embryonnaires mais bloquait la phase d'initiation de la reprogrammation des fibroblastes embryonnaires murins qui implique une transition mésenchymato-épithéliale. Le rôle des enzymes de la famille TET (et de la glycosylase TDG) dans cette transition mésenchymato-épithéliale est d'assurer l'hydroxyméthylation des méthylcytosines des gènes de la famille miR200. En revanche, la déplétion des 3 gènes *TET* n'a aucun impact sur la reprogrammation des kératinocytes et des progéniteurs neuronaux. Les enzymes TET ne sont donc pas indispensables au processus de reprogrammation de tous les types cellulaires (L. David and Hirsch 2014).

Deux mutations du gène *TET2* avaient été identifiées dans les cellules patient A, $TET2^{R1516X}$ et $TET2^{S1691fs}$, cette dernière étant localisée dans le domaine C-terminal qui semble le plus important dans la fonction de ces protéines. La présence de ces mutations n'a pas empêché la reprogrammation des cellules de ce patient, indiquant qu'une perte de fonction de *TET2* n'est pas un obstacle à la reprogrammation des cellules hématopoïétiques en cellules pluripotentes.



La reprogrammation des cellules CD34⁺ de patients atteints de LMMC capture une partie de l'hétérogénéité génétique de la maladie

Dans son travail de thèse, Raphael Itzykson avait déchiffré l'architecture clonale de la LMMC (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013). Le séquençage des monocytes triés dans le sang circulant permet d'identifier un clone souvent unique associant l'ensemble des mutations somatiques du clone, même si un sous-clone apparaît parfois au cours de l'évolution (Merlevede et al. 2016). Par une analyse des progéniteurs à l'échelle unicellulaire, Raphaël Itzykson avait identifié une dominance du clone leucémique dès ce compartiment cellulaire, la plupart des cellules CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺ étant mutées. Pourtant, dans ce compartiment, persistaient des cellules à différents stades de l'évolution clonale, ce qui permettait d'ailleurs de reconstituer l'ordre d'apparition des mutations conductrices de la maladie : la première est le plus souvent une mutation d'un gène codant une protéine régulatrice de l'épigénétique (TET2 étant le plus fréquemment muté), la seconde une mutation d'un gène codant une protéine de la machinerie d'épissage (SRSF2 dans la majorité des cas) et la troisième une mutation d'un gène de la transduction du signal, et plus particulièrement de la voie RAS. Lors du processus de différenciation, les cellules les plus mutées prennent toujours l'avantage sur les autres cellules, expliquant que toutes les mutations soient retrouvées ensemble dans les monocytes. Cette architecture suggère que la compétition entre sous-clones nécessite que le processus de différenciation soit initié et que toute nouvelle mutation qui se fixe dans le clone donne à la cellule mutée un avantage compétitif sur les cellules moins mutées lors de la différenciation (R Itzykson and Solary 2013).

Cette architecture n'est pas observée dans toutes les hémopathies myéloïdes dans lesquelles la dominance du clone peut se manifester à des étapes plus tardives, lors de la différenciation, comme dans la polyglobulie de Vaquez due à la mutation JAK2^{V617F} (Dupont et al. 2007; Anand et al. 2011; Godfrey et al. 2012; Hasan et al. 2013), ou dès les étapes précoces, comme dans la myélofibrose primitive dans lesquelles d'autres mutations, notamment dans TET2, ASXL1 et SRSF2, sont fréquemment associées à JAK2^{V617F} (Delhommeau et al. 2009; Stein et al. 2011; William Vainchenker et al. 2011).

Pour des raisons techniques, les cellules que nous avons reprogrammées étaient des cellules CD34⁺, quelle que soit l'expression de CD38 et CD90. Même si cette population est plus hétérogène que la population CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺, nous espérons reprogrammer des cellules de



génotype distinct, reproduisant les étapes de l'évolution du clone leucémique. Nous avons effectivement capturé une partie de cette hétérogénéité génétique des cellules immatures chez les deux patients étudiés (figure de l'article : figure 1 et supplemental figure 1, 2). Nous n'avons pas assez de matériel cellulaire pour étudier leur architecture clonale à l'échelle unicellulaire mais nous avons réalisé le séquençage des régions codantes du génome dans leurs monocytes triés afin d'avoir un inventaire précis et exhaustif des altérations somatiques de ces régions codantes caractérisant la maladie. Chez le patient que nous appelons « patient A », nous avons eu la surprise de constater que, seuls 2 des 20 clones iPSC génotypés étaient porteurs de la mutation KRAS^{G12D} (figure de l'article : figure 1), ce qui peut s'expliquer de trois façons : les cellules mutées KRAS ne représentaient que 10% des cellules CD34⁺ de cette patiente, ce qui semble peu probable, ou la reprogrammation en iPSCs a contre-sélectionné les cellules présentant des mutations dans KRAS, ce qui reste à expliquer, ou ce résultat n'est que le fruit d'une reprogrammation stochastique.

La reprogrammation de cellules CD34⁺ de patients atteints de LMMC permet de capturer une partie de l'hétérogénéité moléculaire de la maladie. Il serait utile de comparer l'architecture clonale avant reprogrammation à la répartition des clones obtenus pour déterminer si et comment la reprogrammation est influencée par le contexte génétique et identifier d'éventuelles altérations somatiques qui favorisent ou inhibent ce processus.

Le maintien en culture de cellules leucémiques porteuses de mutations des gènes d'épissage s'avère délicat.

Chez le patient que nous avons appelé « patient B », l'analyse des séquences codantes du génome de ses monocytes circulants avait permis d'identifier 23 variants. Cette analyse avait retenu notre attention en révélant la présence de deux mutations hétérozygotes dans des gènes d'épissage : U2AF65^{L187V} et SRSF2^{P95L} (figure de l'article : Supplemental figure 3). La fréquence allélique de ces variants indiquait leur coexistence au sein des mêmes cellules. Il s'agit d'une situation rare (1,4% des patients) puisque les mutations hétérozygotes des gènes du spliceosome sont habituellement mutuellement exclusives (figure 31, [Yoshida et al. 2011; Merlevede et al. 2016]).

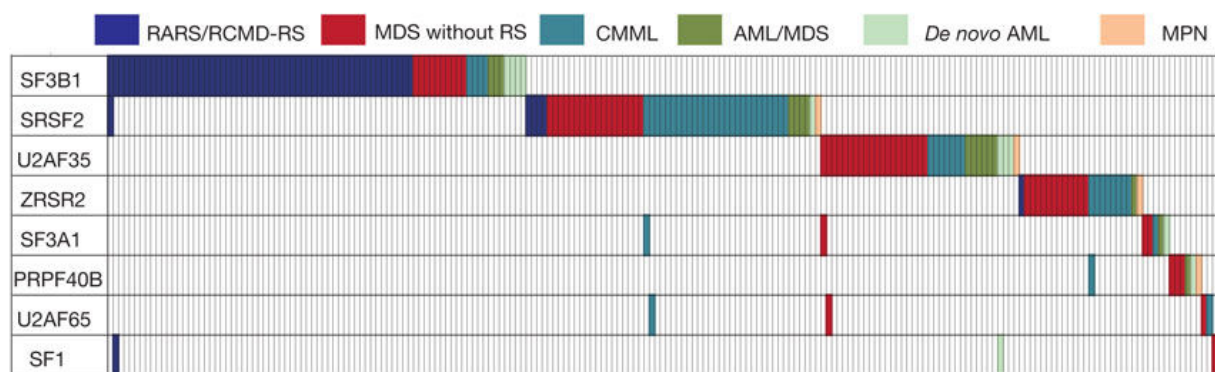


Figure 31 : Distribution des mutations dans 8 gènes de l'épissage.

Le doute persistait sur leur capacité à coexister au sein d'une même cellule (S. C.-W. Lee and Abdel-Wahab 2016). Cette coexistence implique en effet le développement, dans le clone leucémique, de mécanismes de compensation d'une altération très sévère de la machinerie d'épissage. La perte de fonction d'une protéine de la machinerie d'épissage est supposée activer un processus de létalité synthétique dans les cellules dans lesquelles une autre protéine du complexe d'épissage est déjà mutée. Dans le contexte actuel de développement d'inhibiteurs de la machinerie d'épissage à visée thérapeutique, la coexistence de deux mutations de cette machinerie devrait être un facteur de résistance au traitement.

La survenue de mutations des gènes d'épissage dans les hémopathies myéloïdes soulève de très nombreuses questions. Elles affectent principalement 4 gènes (SF3B1, SRSF2, U2AF1 et ZRSR2) dans une machinerie qui implique plus de 300 protéines. Certaines de ces mutations sont préférentiellement associées à d'autres altérations géniques affectant des gènes de la régulation épigénétique : U2AF1 et ASXL1, SF3B1 et DNMT3A, SRSF2 et TET2. Certaines de ces mutations sont aussi préférentiellement associées à un phénotype, par exemple les mutations de SF3B1 sont

associées dans 75% des cas à la présence d'une anémie sidéroblastique (Malcovati et al. 2015) et l'association de mutations dans SRSF2 et TET2 est caractéristique de la LMMC (Malcovati et al. 2014). Chaque mutation a un effet différent sur les fonctions de la protéine correspondante au sein de la machinerie d'épissage : les mutations d'U2AF1 affectent l'inclusion d'exons lors de l'épissage des pré-ARN messagers, celles de SRSF2 modifient l'affinité de la protéine pour les séquences d'ARN sur lesquelles la protéine se fixe. En conséquence, les altérations de l'épissage détectées dans les cellules leucémiques varient en fonction du gène muté et il ne semble pas exister un patron d'altérations caractéristique de la dysplasie myéloïde. Il est possible que d'autres fonctions de ces protéines, par exemple dans la régulation transcriptionnelle et la réparation des dommages de l'ADN, expliquent plus les conséquences de leur mutation sur l'hématopoïèse que l'effet de ces mutations sur l'épissage des pré-ARN messagers.

L'obtention de clones de cellules reprogrammées exprimant simultanément deux de ces gènes mutés dans le contexte d'autres altérations génétiques accumulées au cours de la leucémogénèse permettrait de tenter de répondre à ces diverses questions. Nous avons dérivé de ce patient quatre clones iPS. Tous portaient la mutation U2AF65^{L187V} et trois d'entre eux (B2, B3, B4) étaient également porteurs de la mutation SRSF2^{P95L}. Cette observation répond à une première question : les mutations U2AF65^{L187V} et SRSF2^{P95L} peuvent coexister au sein d'une même cellule.

Le caryotype des clones B1, B3 et B4 a révélé l'acquisition d'une trisomie 17 lors de la reprogrammation. L'acquisition d'une trisomie 17, en particulier dans la région 17q21.3-qter, est un événement observé dans 10 à 30% des lignées de cellules souches embryonnaires humaines (cellules ES) et des clones de cellules pluripotentes induites au cours de leur culture. Les autres chromosomes fréquemment concernés sont les chromosomes 1, 12 et 20. Sur ce dernier chromosome, l'amplification de la région 20q11.21 dans laquelle sont codés ID1, BCL2L1 et HM13, est observée dans plus 20% des clones et l'amplification du gène BCL2L1 contribuerait au maintien des clones en culture (Amps et al. 2011). Le gène SRSF2 est codé par le chromosome 17 en 17q25. Il est possible que l'acquisition d'un chromosome supplémentaire, supposé porter une version non mutée du gène SRSF2 (ce qui reste à vérifier), permette de compenser les effets de la mutation de SRSF2 qui induit une haplo-insuffisance.

Dans le clone B2, nous avons observé un autre phénomène : l'élimination de la mutation SRSF2^{P95L} par perte d'hétérozygotie dans la région 17q25 détectée par hybridation génomique comparative. La persistance de la mutation des gènes de l'épissage ne semble pas nécessaire à la maintenance de la maladie. Par exemple, les cellules Ba/F3 dans lesquelles U2AF1^{S34F} est exprimé

deviennent indépendantes des cytokines et cette caractéristique persiste lorsque le gène muté est secondairement éliminé du clone (S. M. Park et al. 2016). Ces mutations seraient donc plus importantes pour l'installation de la maladie que pour sa maintenance (Joshi, Halene, and Abdel-Wahab 2017). Elles font d'ailleurs partie des mutations communément identifiées dans les clones pré-leucémiques liés à l'âge dont l'apparition précède le plus souvent l'émergence d'une hémopathie myéloïde chronique, en particulier d'un syndrome myélodysplasique ou d'une LMMC (Sperling, Gibson, and Ebert 2016; Mason et al. 2016).

Nous n'avons pas réussi à capturer de cellules non mutées en reprogrammant les cellules CD34⁺ des 2 patients atteints de LMMC. Ceci peut être expliqué par la dominance clonale précoce observée dans cette maladie : chez la plupart des patients, la majorité des cellules CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺ sont des cellules porteuses d'au moins une mutation somatique récurrente et il est généralement difficile de détecter une cellule non mutée au sein de 100 cellules analysées (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013). Outre l'intérêt de comparer les cellules sauvages et les cellules mutées d'un même patient, la reprogrammation de cellules non mutées ouvrirait théoriquement la porte à une thérapie cellulaire autologue. En septembre 2014, une patiente japonaise de 70 ans est devenue la première patiente au monde à recevoir une greffe de cellules dérivées d'iPSC humaines, en l'occurrence des cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes (Reardon and Cyranoski 2014). Après une pause transitoire pour différentes raisons (Garber 2015), un second patient a été inclus et les résultats rapportés cette année, un an après la seconde greffe (Mandai et al. 2017). Outre le fait que l'on peut discuter la pertinence d'une thérapie cellulaire autologue dans une hémopathie myéloïde chronique comme la LMMC, l'utilisation clinique des iPSC en hématologie s'orientent plus activement vers la correction de déficits génétiques constitutifs (Noh et al. 2015) et la production de cellules sanguines matures susceptibles d'être utilisées en transfusion (Hirose et al. 2013; Nakamura et al. 2014; Ackermann et al. 2015).

Nos travaux ont confirmé que la coexistence de deux mutations somatiques affectant des gènes d'épissage au sein d'une même cellule est possible. Ils ont aussi montré que les cellules porteuses de mutations de gènes d'épissage semblent mettre en jeu de multiples mécanismes pour éliminer, par recombinaison ou délétion, ou compenser, par duplication de l'allèle sain, ces altérations. Les clones établis à partir de ce patient se sont révélés difficiles à entretenir et à conserver en culture, sans qu'il soit possible d'affirmer que cela est dû aux mutations des gènes d'épissage.

La compréhension de l'impact de ces mutations d'identification récente est encore très incomplète et les modèles imparfaits pour distinguer leur impact sur l'épissage de celui sur la réparation de l'ADN, l'expression des gènes ou d'autres fonctions cellulaires.

Les clones reproduisent les caractéristiques de la maladie du patient.

La différenciation des iPSCs en cellules hématopoïétiques CD34⁺, CD43⁺ est bien codifiée et s'accompagne d'une extinction des gènes de pluripotence. Cette population est enrichie en cellules souches et progénitrices hématopoïétiques.

Au cours du développement embryonnaire des mammifères, une hématopoïèse dite « primitive » précède l'émergence d'une hématopoïèse « définitive » qui se distingue par la capacité des cellules souches hématopoïétiques à générer des lymphocytes T et B et à reconstituer une hématopoïèse normale après greffe à un animal irradié (Yoder 2014). En culture, les cellules souches pluripotentes forment des cellules du mésoderme qui génèrent secondairement des cellules hématopoïétiques à partir d'un progéniteur hémato-endothélial. Dans ce contexte, la distinction entre hématopoïèse primitive et définitive est plus floue, les deux coexistent et leur place dépend des conditions expérimentales (Ackermann et al. 2015). Par exemple, les cellules du mésoderme KDR⁺/CD235a⁺ sont les précurseurs d'une hématopoïèse primitive alors que les cellules KDR⁺/CD235a⁻ sont les précurseurs d'une hématopoïèse définitive capable de produire des cellules T sur des cellules OP-9 (Sturgeon et al. 2014).

La génération de cellules sanguines matures à partir des cellules progénitrices hématopoïétiques CD34⁺, CD43⁺ issues d'iPSC humaines est également bien établie et il est envisagé d'optimiser la génération de cellules matures pour la production de globules rouges (Olivier et al. 2016) et surtout de plaquettes (Sugimoto and Eto 2017) utilisables en transfusion sanguine. La génération de cellules sanguines matures à partir des cellules progénitrices hématopoïétiques CD34⁺, CD43⁺ nécessite quelques cytokines clefs dont le SCF, l'EPO et la TPO pour la différenciation érythro-mégacaryocytaire ou le SCF, l'IL3 et l'IL6 pour la différenciation myéloïde. La génération de progéniteurs lymphoïdes implique quant à elle une autre combinaison de cytokines (SCF, FLT3L, IL3, IL7, IL15) et des cellules stromales OP9 (Ackermann et al. 2015).

En induisant la différenciation hématopoïétique des cellules progénitrices CD34⁺, CD43⁺ issues d'iPSC, nous avons observé une augmentation du nombre de CFU-GM générées en milieu semi-solide, un défaut de différenciation macrophagique des CFU-M, et une augmentation du nombre et de la taille des CFU-MK, faites de mégacaryocytes peu plaquetto-gènes. En outre, la décitabine affecte la production de cellules hématopoïétiques matures à partir des progéniteurs issus d'iPS dérivées de cellules de patients. Ces caractéristiques générales reproduisent les caractéristiques cliniques et biologiques de la maladie chez la patiente A.



Le caractère prolifératif d'une LMMC est habituellement attribué à la présence de mutations induisant une activation constitutive de la signalisation intracellulaire et/ou une hypersensibilité à certaines cytokines. La LMMJ se caractérise par une hypersensibilité des progéniteurs myéloïdes au GM-CSF induisant une hyperphosphorylation de STAT5 (Kotecha N et al, Cancer Cell 2008). Les iPSCs établies à partir de cellules de patients atteints de LMMJ avec mutation PTPN11^{E76K} reproduisent cette caractéristique : les tests en méthylcellulose révèlent une augmentation d'un facteur 2 à 3 du nombre de colonies myéloïdes générées à partir des progéniteurs hématopoïétiques dérivés de ces iPSCs. Ces progéniteurs prolifèrent aussi en milieu liquide avec activation de STAT5 et sont sensibles aux inhibiteurs de la voie MEK (Chan and Yoder 2013; Mulero-Navarro et al. 2015; Gandre-Babbe et al. 2013). L'hypersensibilité des progéniteurs hématopoïétiques au GM-CSF est réputée plus inconstante dans la LMMC et corrélée à la présence de mutations de gènes de la signalisation (Raphaël Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013), même si l'analyse de la phosphorylation de STAT5 suggère que l'hypersensibilité des progéniteurs myéloïdes au GM-CSF n'est pas limitée aux formes mutées sur la voie Ras (Padron et al. 2013). De manière un peu inattendue, nous n'avons pas observé d'impact de la mutation KRAS^{G12D} sur la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques en présence de SCF et de concentrations croissantes de GM-CSF. En revanche, les colonies générées par les cellules mutées KRAS^{G12D} sont de plus grande taille, et la quantité de monocytes générés en culture liquide est plus élevée en présence de cette mutation.

La génération de cellules hématopoïétiques matures à partir de cellules progénitrices CD34⁺,CD43⁺ issues d'iPSCs de patients atteints de LMMC, en milieu semi-solide ou en milieu liquide, récapitule certaines des caractéristiques de la maladie. La réponse au GM-CSF mériterait d'être étudiée de façon plus précise, notamment en associant, au phénotypage des cellules formées en milieu liquide, une étude cinétique plus prolongée et un marquage phospho-STAT5 intracellulaire.

L'hétérogénéité fonctionnelle et épigénétique ne reflète pas la seule hétérogénéité génétique

Si les clones iPSC établis à partir de cellules de patients reproduisent globalement les caractéristiques de la maladie, ils démontrent aussi une certaine hétérogénéité phénotypique, y compris entre clones génétiquement homogènes, suggérant que des facteurs additionnels influencent leur comportement en culture. Une classification ascendante hiérarchique basée sur la mesure de la diversité phénotypique entre les clones en milieu liquide montre plus de similitudes entre A2 et A3, qui ont deux fonds génétiques distincts, qu'entre A3 et A5 qui ont un fond génétique en apparence identique, incluant la mutation de KRAS mutés (supplemental figure 11). Cette observation est à rapprocher du fait que l'hétérogénéité de l'expression clinique de la LMMC est très supérieure à son hétérogénéité génétique (Ball, List, and Padron 2016). Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette hétérogénéité phénotypique.

La première est que les effets épigénétiques de la reprogrammation (Chao et al. 2017) génèrent *in fine* une hétérogénéité épigénétique supérieure à l'hétérogénéité génétique. Cette hypothèse est rendue peu vraisemblable par l'homogénéité non seulement du comportement phénotypique des clones établis à partir de cellules de sujets sains, mais aussi de l'homogénéité de la méthylation de leur ADN analysé en *enhanced reduced representation bisulfite sequencing* (eRRBS), à l'exception toutefois du clone Co1.

La seconde s'appuie sur le fait que l'analyse génétique des clones n'a porté que sur les régions codantes du génome; même si aucune mutation récurrente des régions non codantes n'a été détectée jusqu'alors dans la LMMC (Merlevede et al. 2016), on ne peut exclure définitivement l'existence de variants non codants, comme les mutations récurrentes du promoteur de la télomérase identifiées dans des tumeurs solides (Mélanome, hépatocarcinomes) et les mutations de promoteurs de gènes conducteurs identifiées dans les cancer du sein (Rheinbay et al. 2017).

La troisième se base sur la notion d'hétérogénéité épigénétique au sein d'un clone malin. Les variations épigénétiques influencent la capacité de différenciation des iPSCs (Nishizawa et al. 2016). Le lien entre anomalies génétiques et épigénétiques au sein d'un clone malin reste un sujet de controverses : certains plaident en faveur d'une évolution conjointe (Brocks et al. 2014; Oakes et al. 2014; Mazor et al. 2016; Hao et al. 2016), d'autres en faveur d'une évolution disjointe, l'hétérogénéité épigénétique étant indépendante de la présence de mutations somatiques dans des gènes codant des régulateurs comme TET2, IDH1/2 ou DNMT3A (S. Li et al. 2016). Beaucoup d'auteurs s'accordent cependant sur le fait que l'hétérogénéité épigénétique intraclonale est un



marqueur de l'évolution clonale (Landau et al. 2015; H. Pan et al. 2015; Guièze and Wu 2015; Shaknovich, De, and Michor 2014). La capacité des agents déméthylants à restaurer une hématopoïèse équilibrée sans éradiquer les cellules mutées (Merlevede et al. 2016) souligne l'importance des altérations épigénétiques dans l'expression clinique de la LMMC. Le patron de méthylation de certaines régions régulatrices de l'ADN prédit la réponse aux agents déméthylants (Meldi et al. 2015; Unnikrishnan et al. 2017). En outre, la délétion dans les cellules myéloïdes murines du gène trim33, dont le promoteur des méthylé chez 40% des patients atteints de LMMC, induit un phénotype qui mime la LMMC, suggérant qu'une altération épigénétique suffit à reproduire la maladie (Aucagne et al. 2011). Enfin, un rôle des ARN non codants dans la reprogrammation et la différenciation des clones iPS ne peut être définitivement écarté (Vitaloni et al. 2014).

La quatrième est celle d'une dérive génétique des clones iPS en culture. Nous avons écarté les clones dans lesquels la reprogrammation proprement dite avait induit des altérations chromosomiques comme une trisomie 17 et observé la délétion d'un allèle SRSF2 muté dans un clone B, indiquant qu'une évolution génétique des clones est possible et pourrait contribuer à l'hétérogénéité phénotypique observée.

La cinquième et dernière hypothèse est que la reprogrammation des cellules CD34+ concerne des cellules initialement hétérogènes dans leur capacité de différenciation (Perié et al. 2014; Velten et al. 2017; Yu et al. 2017) et que cette hétérogénéité est conservée après reprogrammation. Cette situation, qui devrait aussi être observée lors de la reprogrammation des cellules de sujets sains, ne peut être définitivement écartée.

Les raisons de l'hétérogénéité du phénotype de clones iPSC génétiquement identique restent hypothétiques. Il sera nécessaire de vérifier la séquence des clones utilisés après 3 années de culture continue afin de s'assurer de l'absence d'acquisition de variants significatifs et de réaliser un séquençage complet du génome à la recherche de variants des régions non codantes, ce qui nécessitera le séquençage du génome complet des cellules CD3⁺ des patients en parallèle.

L'introduction de la mutation SRSF2^{P95H} dans les cellules du patient A modifie le phénotype

Les progrès des technologies de « gene editing » permettent de modifier les clones iPSC, par exemple de corriger une anomalie génétique constitutive en vue d'une thérapie cellulaire réparatrice comme dans la bêta-thalassémie (Niu et al. 2016) ou la maladie plaquettaire familiale prédisposant aux hémopathies myéloïdes [FPD-AML, (Iizuka et al. 2015)], ou d'induire des modifications stimulant la production de cellules sanguines matures à des fins de transfusion (Nakamura et al. 2014; Hirose et al. 2013). Nous avons utilisé la technologie CRISPR/Cas9 pour introduire la mutation SRSF2^{P95H} dans des clones sauvages ou mutés ne l'exprimant pas.

L'impact de la mutation sur la différenciation hématopoïétique n'a été étudiée que dans un seul clone, le clone A3 porteur de la mutation KRAS^{G12D}. Si nous avons observé une certaine toxicité de la mutation avec un nombre un peu plus élevé de cellules DAPI⁺ à la fin de la différenciation hématopoïétique des cellules mutées SRSF2^{P95H} comparées aux cellules A3 parentales, le nombre total de cellules générées n'était pas significativement diminué. Cela indique que, dans un contexte d'altérations génétiques caractéristiques de la LMMC, l'addition d'un allèle muté SRSF2 est compatible avec la survie du clone. Nous avons observé que la mutation augmentait la production de cellules CD14⁺ en milieu liquide, aux dépens des progéniteurs CD123⁺, modifiant significativement le profil de différenciation hématopoïétique du clone. En milieu semi-solide, cette mutation a un impact limité sur le nombre de colonies générées mais augmente très fortement le nombre de cellules CD14⁺ au sein des CFU-GM. L'ensemble de ces résultats suggère que la mutation SRSF2 contribue fortement au biais de production des monocytes chez les patients atteints de LMMC.

Si nos résultats suggèrent fortement que la mutation SRSF2^{P95H} amplifie le biais de différenciation monocyttaire lorsqu'elle est introduite dans les cellules du clone A3 portant deux mutations de TET2 et une mutation de KRAS, il serait très utile d'évaluer l'impact de la mutation dans d'autres contextes génétiques, par exemple dans le clone A5 dont le fond génétique est similaire mais dont la différenciation monocyttaire est déjà très amplifiée, et dans des cellules sauvages, afin d'explorer la tolérance de la mutation et son impact lorsqu'elle est isolée, mimant une hématopoïèse clonale liée à l'âge.

Les agents hypométhylants ont un effet direct sur les cellules du clone leucémique

Les agents hypométhylants 5-azacytidine (azacytidine) et, dans le cadre d'essais cliniques, 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine), sont actuellement le traitement de première ligne des patients atteints de LMMC dysplasique sévère non éligibles à la transplantation. Ce traitement ne guérit pas la maladie car il n'élimine pas les cellules mutées et ne prévient pas l'évolution génétique du clone, mais il restaure une hématopoïèse plus équilibrée chez les sujets répondeurs, ce qui est associé à une déméthylation efficace de l'ADN (Merlevede et al. 2016).

Le mécanisme d'action des agents déméthylants reste un sujet de controverses. Ces médicaments peuvent avoir des effets cytotoxiques ou cytostatiques et différenciant sur les cellules malades. Ils peuvent aussi modifier le comportement des cellules du microenvironnement médullaire, notamment des cellules de la réponse immunitaire. L'azacytidine a d'abord été développée comme un agent cytotoxique classique et utilisée à fortes doses mais cette stratégie s'est révélée peu efficace. Les agents hypométhylants sont maintenant utilisés à faibles doses pour inhiber la méthylation de l'ADN au cours du cycle cellulaire. De ce fait, il faut attendre plusieurs cycles de traitement pour évaluer leur effet thérapeutique.

Le traitement des cellules CD34⁺, CD43⁺ issues de la différenciation des iPSCs dérivés de nos clones par 10 nM de decitabine pendant 72 heures n'a pas d'effet cytotoxique significatif par rapport aux cellules non-traitées. Ce traitement module les capacités de différenciation de ces cellules de façon hétérogène. La différence de réponse entre clones, par exemple entre A1 (pas de réponse) et A3S (modulation des capacités de différenciation), suggère que toutes les cellules d'un clone leucémique ne répondent pas de manière identique.

Il est intéressant de constater l'efficacité du traitement sur le clone A3S : après seulement 3 jours d'exposition à une dose non cytotoxique du médicament, on observe un phénotype se rapprochant de celui des cellules contrôles. Ce résultat est d'autant plus significatif que les effets du médicament nécessitent entre 5 (decitabine) et 7 (azacytidine) jours de traitement tous les 28 jours pendant plusieurs mois avant d'observer d'éventuels effets bénéfiques (40-60% des patients). En clinique, il est recommandé d'attendre d'avoir réalisé 6 cycles de traitement avant d'affirmer l'échec thérapeutique.

Si ces résultats sont validés par des études complémentaires, ils signifient que les effets de ces médicaments sur les cellules tumorales sont suffisants pour générer une réponse



thérapeutique. Plusieurs équipes suggèrent que l'efficacité des agents hypométhylants passe par la diminution du nombre des lymphocytes T régulateurs (Diesch et al. 2016) ou l'induction d'une réponse immunitaire via la réexpression, par les cellules leucémiques, d'antigènes tumoraux et la mobilisation de rétrovirus endogènes (ERV) induisant une réponse interféron (Diesch et al. 2016; Wolff et al. 2017; Chiappinelli et al. 2015; Roulois et al. 2015; Licht 2015; Tobiasson et al. 2017). Un effet de ces médicaments sur le microenvironnement n'est donc pas exclu pour rétablir une hématopoïèse plus équilibrée, ce que le modèle iPS ne permet pas d'explorer.

Les modèles iPS peuvent permettre l'étude des effets intrinsèques des agents hypométhylants sur chaque sous-clone. En utilisant une dose non-cytotoxique, nous isolons la réponse épigénétique des cellules du clone leucémique avec une réponse hétérogène. Il serait intéressant d'étendre ce travail à l'ensemble des clones et d'explorer l'activité d'autres molécules, en particulier des inhibiteurs du spliceosome et des inhibiteurs de la transduction du signal.

L'analyse des clones de cellules reprogrammées devrait permettre d'explorer une partie des facteurs extrinsèques contribuant à l'évolution du clone leucémique

La trisomie 17 et la LOH en 17q25 apparues dans les clones iPSC du patient B suggèrent une forte pression de sélection vis-à-vis de la mutation SRSF2^{P95L}. La difficulté à maintenir ces clones en culture *in vitro*, même après la survenue ces réarrangements chromosomiques, suggère que leur succès reproductif *in vivo* implique le soutien du microenvironnement médullaire et/ou des coopérations entre sous-clones.

Le microenvironnement joue un rôle important dans l'émergence et le développement des cancers en général et des hémopathies myéloïdes en particulier (Schepers et al. 2013; Medyouf 2017). Inversement, les cellules myéloïdes mutées constituent en elles-mêmes un microenvironnement favorable au développement de maladies, par exemple neuro-dégénératives (Mass et al. 2017), et l'hématopoïèse clonale TET2 mutée favorise le développement de l'athérosclérose, vraisemblablement par son impact sur les macrophages (Fuster et al. 2017).

Un dialogue entre cellules du clone leucémique et un dialogue entre ces cellules et le microenvironnement médullaire peuvent avoir un effet d'amplification dans la progression des hémopathies myéloïdes chroniques : un clone émerge et génère des cellules matures altérées qui participent à la constitution d'un microenvironnement dégradé qui promeut l'évolution du clone malade. L'étude de modèles murins de leucémie myéloïde chronique suggère l'existence de boucles de rétrocontrôle entre cellules matures du clone leucémique et cellules souches normales et leucémiques via la production de cytokines, et en particulier d'IL-6 (Reynaud et al. 2011). Dans ce modèle, la neutralisation de l'IL-6 prévient l'installation de la maladie (Welner et al. 2015).

Dans la LMMC, il serait intéressant de connaître le rôle des macrophages et des ostéoclastes générés par les cellules du clone et intégrés au microenvironnement médullaire dans la progression de la maladie. Des travaux en cours dans notre équipe indiquent 1) que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui forment des îlots dans la moelle de 20% des patients atteints de LMMC font partie du clone leucémique, modulent la prolifération de cellules médullaires CD34⁺ en co-culture, et modifient l'environnement immunologique en favorisant l'accumulation de cellules T régulatrices (Nolwenn Lucas, Matthieu Duchmann, non publié) ; 2) que les souris dans lesquelles le gène *tet2* est supprimé produisent plus de la cytokine *macrophage-inhibitory factor* (MIF) car la transcription du gène est réprimée par TET2 et MIF, produit en excès par les monocytes de patients ayant une mutation de TET2, induit un biais de



différenciation granulomonocytaire des cellules souches hématopoïétiques (Nathalie Droin, non publié).

Au-delà des cellules dérivées du clone leucémique, d'autres cellules constituent ce microenvironnement. Il s'agit de cellules souches mésenchymateuses et de cellules qui en dérivent (adipocytes, ostéoblastes, chondrocytes), de fibroblastes, de cellules nerveuses et de cellules endothéliales.

L'observation la plus intrigante, étayée par plusieurs modèles murins génétiquement modifiés, est que des mutations de cellules stromales peuvent générer l'émergence de clones leucémiques. Ce concept est apparu en 2005 quand la délétion du gène codant $\kappa B\alpha$ dans les cellules myéloïdes de souris s'est avérée ne pas reproduire le syndrome myéloprolifératif développé par les souris dans lesquelles la délétion est constitutive (Rupec et al. 2005). Deux ans plus tard, il était montré que la délétion du gène codant le récepteur gamma de l'acide rétinoïque dans les cellules stromales mésenchymateuses induit une surproduction de $TNF\alpha$ conduisant à l'émergence d'un syndrome myéloprolifératif (Walkley et al. 2007). En 2010, c'est la délétion de l'enzyme Dicer 1 dans les cellules stromales mésenchymateuses qui induisait, dans certaines conditions, une myélodysplasie (Raaijmakers et al. 2010). Plus récemment, les mutations constitutives de PTPN11 (Dong et al. 2016) et SBDS (Zambetti et al. 2016), qui prédisposent à la survenue de néoplasmes myéloïdes, induisaient l'émergence de ces maladies en n'étant présentes que dans certaines cellules du microenvironnement médullaire. Très souvent, les effets des cellules mutées du microenvironnement sont générés par des cytokines inflammatoires comme le TNF, l'IL-6 et S100A9, qui induisent, au niveau des cellules souches et progénitrices, une surproduction de radicaux libres de l'oxygène qui endommagent l'ADN et conduisent à l'émergence de cellules mutées (García-Fernández and Méndez-Ferrer 2016).

Diverses interactions ont été décrites entre cellules du clone et cellules de l'environnement dans les hémopathies myéloïdes. Dans les néoplasmes myéloprolifératifs $JAK2^{V617F}$, les cellules souches et progénitrices mutées produisent de l'interleukine-1 beta (IL-1 β), laquelle provoque des dommages au niveau des fibres nerveuses sympathiques du microenvironnement médullaire, conduisant à une perte de cellules stromales mésenchymateuses (Arranz et al. 2014). Dans les syndromes myélodysplasiques, les cellules souches mésenchymateuses altérées freinent la prolifération des cellules souches et progénitrices normales et favorisent l'expansion clonale des cellules souches et progénitrices mutées *in vitro* (Geyh et al. 2013; Ferrer et al. 2013; Tennant et al. 2000) et *in vivo* (Sacchetti et al. 2007; X Li et al. 2013; Kerbauy et al. 2017). Ces cellules souches



mésenchymateuses pourraient jouer aussi un rôle immunosuppresseur par inhibition des cellules T (Zhao et al. 2010; Duffy et al. 2011) ou sécrétion de nombreuses cytokines (Haddad and Saldanha-Araujo 2014; M. Li et al. 2014; Sato et al. 2015; Luz-Crawford et al. 2016) . Les données préliminaires de notre équipe montrent que les MSCs de LMMC ont un défaut de prolifération similaire à celui décrit dans les syndromes myélodysplasiques.

Les cellules endothéliales des patients atteints d'hémopathie myéloïde diffèrent des cellules des sujets sains sur le plan génétique et épigénétique (Teofili et al. 2015). Les cellules du clone peuvent induire l'expansion des cellules endothéliales (Hanoun et al. 2014; Hatfield et al. 2009) et modifier leur phénotype, par exemple induire l'expression de molécules d'adhésion qui permettent le maintien des cellules souches et progénitrices dans un état quiescent les rendant résistantes aux chimiothérapies (Pezeshkian et al. 2013; Sipkins et al. 2005).

Enfin, au sein d'un clone malin, les sous-clones peuvent entretenir des relations de coopération : les cytokines produites par un sous-clone de cellules cancéreuses peuvent favoriser l'expansion d'autres sous-clones (mutualisme), voire permettre le maintien de sous-clones dépendant de cette interaction (commensalisme). Dans les deux cas, le succès reproductif des sous-clones concernés n'est pas réductible à leurs propriétés intrinsèques et dépend dans une large mesure de la présence d'autres sous-clones (Marusyk et al. 2014). De telles relations de coopération et de dépendance entre sous-clones ont été identifiées dans des cancers solides (Lim et al. 2017; Cleary et al. 2014). Dans les hémopathies myéloïdes, la perte de fonction de TET2 dans les macrophages entraîne l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 (Q. Zhang et al. 2015) et d'IL-1 qui, directement ou indirectement, augmente l'avantage prolifératif des CSH mutées dans les SMP (cf Arranz et al. 2014).

L'importance des interactions entre cellules du clone et entre clone leucémique et son environnement dans l'émergence et la progression des hémopathies myéloïdes indique que les résultats de l'analyse des cellules pluripotentes induites cultivées isolément devront être complétés par l'étude des interactions de ces clones avec des cellules stromales et d'autres cellules du microenvironnement, *in vitro* et *in vivo*, et par des expériences de co-culture de clones de fond génétique différent à la recherche d'interactions et de compétitions.

Bibliographie

- Ackermann, Mania, Steffi Liebhaber, Jan-Henning Klusmann, and Nico Lachmann. 2015. "Lost in Translation: Pluripotent Stem Cell-Derived Hematopoiesis." *EMBO Molecular Medicine* 7 (11): 1388–1402. doi:10.15252/emmm.201505301.
- Akashi, Koichi, David Traver, Toshihiro Miyamoto, and Irving L. Weissman. 2000. "A Clonogenic Common Myeloid Progenitor That Gives Rise to All Myeloid Lineages." *Nature* 404 (6774): 193–97. doi:10.1038/35004599.
- Alexandrov, Ludmil B, Philip H Jones, David C Wedge, Julian E Sale, Peter J Campbell, Serena Nik-Zainal, and Michael R Stratton. 2015. "Clock-like Mutational Processes in Human Somatic Cells." *Nature Genetics* 47 (12). Nature Publishing Group: 1402–7. doi:10.1038/ng.3441.
- Amabile, Giovanni, Robert S Welner, Cesar Nombela-Arrieta, Anna Morena D'Alise, Annalisa Di Ruscio, Alexander K Ebralidze, Yevgenya Kravtsov, et al. 2013. "In Vivo Generation of Transplantable Human Hematopoietic Cells from Induced Pluripotent Stem Cells." *Blood* 121 (8): 1255 LP-1264. doi:10.1182/blood-2012-06-434407.
- Amps, Katherine, Peter W Andrews, George Anyfantis, Lyle Armstrong, Stuart Avery, Hossein Baharvand, Julie Baker, et al. 2011. "Screening Ethnically Diverse Human Embryonic Stem Cells Identifies a Chromosome 20 Minimal Amplicon Conferring Growth Advantage." *Nature Biotechnology* 29 (12): 1132–44. doi:10.1038/nbt.2051.
- Anand, Shubha, Frances Stedham, Philip Beer, Emma Gudgin, Christina a Ortmann, Anthony Bench, Wendy Erber, Anthony R Green, Brian J P Huntly, and Washington Dc. 2011. "Effects of the JAK2 Mutation on the Hematopoietic Stem and Progenitor Compartment in Human Myeloproliferative Neoplasms Brief Report Effects of the JAK2 Mutation on the Hematopoietic Stem and Progenitor Compartment in Human Myeloproliferative Neoplasms." *Hematology* 118 (1): 177–81. doi:10.1182/blood-2010-12-327593.
- Anczuków, Olga, Avi Z Rosenberg, Martin Akerman, Shipra Das, Lixing Zhan, Rotem Karni, Senthil K Muthuswamy, and Adrian R Krainer. 2012. "The Splicing Factor SRSF1 Regulates Apoptosis and Proliferation to Promote Mammary Epithelial Cell Transformation." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (2): 220–28. doi:10.1038/nsmb.2207.
- Anderson, Kristina, Christoph Lutz, Frederik W. van Delft, Caroline M. Bateman, Yanping Guo, Susan M. Colman, Helena Kempster, et al. 2011. "Genetic Variability of Clonal Architecture and Propagating Cells in Leukaemia." *Nature* 469 (7330). Nature Publishing Group: 356–61. doi:10.1038/nature09650.
- Antony-Debré, Iléana, Vladimir T. Manchev, Nathalie Balayn, Dominique Bluteau, Cécile Tomowiak, Céline Legrand, Thierry Langlois, et al. 2015. "Level of RUNX1 Activity Is Critical for Leukemic Predisposition but Not for Thrombocytopenia." *Blood* 125 (6): 930–40. doi:10.1182/blood-2014-06-585513.
- Arber, Daniel A, Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Michael J Borowitz, Michelle M Le Beau, Clara D Bloomfield, Mario Cazzola, and James W Vardiman. 2016. "The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia." *Blood* 127 (20): 2391–2406. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
- Arranz, Lorena, Abel Sánchez-Aguilera, Daniel Martín-Pérez, Joan Isern, Xavier Langa, Alexandar Tzankov, Pontus Lundberg, et al. 2014. "Neuropathy of Haematopoietic Stem Cell Niche Is Essential for Myeloproliferative Neoplasms." *Nature*. doi:10.1038/nature13383.
- Athuluri-Divakar, Sai Krishna, Rodrigo Vasquez-Del Carpio, Kaushik Dutta, Stacey J. Baker, Stephen C. Cosenza, Indranil Basu, Yogesh K. Gupta, et al. 2016. "A Small Molecule RAS-Mimetic Disrupts RAS Association with Effector Proteins to Block Signaling." *Cell* 165 (3). Elsevier Inc.: 643–55. doi:10.1016/j.cell.2016.03.045.
- Aucagne, R, N Droin, J Paggetti, B Lagrange, A Largeot, A Hammann, A Bataille, et al. 2011. "Transcription Intermediary Factor 1 Gamma Is a Tumor Suppressor in Mouse and Human Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2361–70. doi:10.1172/JCI45213DS1.
- Bagci, Hakan, and Amanda G. Fisher. 2013. "Dna Demethylation in Pluripotency and Reprogramming: The Role of Tet Proteins and Cell Division." *Cell Stem Cell* 13 (3). Elsevier Inc.: 265–69. doi:10.1016/j.stem.2013.08.005.
- Ball, Markus, Alan F. List, and Eric Padron. 2016. "When Clinical Heterogeneity Exceeds Genetic Heterogeneity: Thinking Outside the Genomic Box in Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Blood* 128 (20): 2381–87. doi:10.1182/blood-2016-07-692988.
- Beerman, Isabel, Christoph Bock, Brian S. Garrison, Zachary D. Smith, Hongcang Gu, Alexander Meissner, and Derrick J. Rossi. 2013. "Proliferation-Dependent Alterations of the DNA Methylation Landscape Underlie Hematopoietic Stem Cell Aging." *Cell Stem Cell* 12 (4). Elsevier Inc.: 413–25. doi:10.1016/j.stem.2013.01.017.
- Bennett, J M, D Catovsky, M T Daniel, G Flandrin, D A Galton, H R Gralnick, and C Sultan. 1982. "Proposal for the Classification of the Myelodysplastic Syndromes." *British Journal of Haematology* 51 (2): 189–99. doi:10.1111/j.1365-2141.1982.tb02771.x.
- Berk PD, Goldberg JD, Silverstein MN, Weinfeld A, Donovan PB, Ellis JT, Landaw SA, Laszlo J, Najean Y, Pisciotta AV, Wasserman LR. 1981. "Increased Incidence of Acute Leukemia in Polycythemia Vera Associated with Chlorambucil Therapy." *N Engl J Med* 19 (304): 441–47.
- Bernasconi, Paolo, Catherine Klersy, Marina Boni, Paola M. Cavigliano, Silvia Calatroni, Ilaria Giardini, Barbara Rocca, et al. 2007. "World Health Organization Classification in Combination with Cytogenetic Markers Improves the Prognostic Stratification of Patients with de Novo Primary Myelodysplastic Syndromes." *British Journal of Haematology* 137 (3): 193–205. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06537.x.
- Bertrand, Julien Y., Neil C. Chi, Buyung Santoso, Shutian Teng, Didier Y. R. Stainier, and David Traver. 2010. "Haematopoietic Stem



- Cells Derive Directly from Aortic Endothelium during Development." *Nature* 464 (7285). Nature Publishing Group: 108–11. doi:10.1038/nature08738.
- Boisset, Jean-Charles, Wiggert van Cappellen, Charlotte Andrieu-Soler, Niels Galjart, Elaine Dzierzak, and Catherine Robin. 2010. "In Vivo Imaging of Haematopoietic Cells Emerging from the Mouse Aortic Endothelium." *Nature* 464 (7285). Nature Publishing Group: 116–20. doi:10.1038/nature08764.
- Boutros, Paul C, Michael Fraser, Nicholas J Harding, Richard de Borja, Dominique Trudel, Emilie Lalonde, Alice Meng, et al. 2015. "Spatial Genomic Heterogeneity within Localized, Multifocal Prostate Cancer." *Nature Genetics* 47 (7). Nature Publishing Group: 736–45. doi:10.1038/ng.3315.
- Bozic, I., T. Antal, H. Ohtsuki, H. Carter, D. Kim, S. Chen, R. Karchin, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and M. A. Nowak. 2010. "Accumulation of Driver and Passenger Mutations during Tumor Progression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (43): 18545–50. doi:10.1073/pnas.1010978107.
- Braun, Thorsten, Raphael Itzykson, Aline Renneville, Benoit De Renzis, Kamel Laribi, Krime Bouabdallah, Norbert Vey, et al. 2011. "Molecular Predictors of Response to Decitabine in Advanced Chronic Myelomonocytic Leukemia : A Phase 2 Trial." *Blood* 118 (14): 3824–31. doi:10.1182/blood-2011-05-352039.
- Brocks, David, Yassen Assenov, Sarah Minner, Olga Bogatyrova, Ronald Simon, Christina Koop, Christopher Oakes, et al. 2014. "Intratumor DNA Methylation Heterogeneity Reflects Clonal Evolution in Aggressive Prostate Cancer." *Cell Reports* 8 (3): 798–806. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.053.
- Busque, Lambert, Jay P Patel, Maria E Figueroa, Aparna Vasanthakumar, Sylvie Provost, Zineb Hamilou, Luigina Mollica, et al. 2012. "Recurrent Somatic TET2 Mutations in Normal Elderly Individuals with Clonal Hematopoiesis." *Nature Genetics* 44 (11). Nature Publishing Group: 1179–81. doi:10.1038/ng.2413.
- Busque, L, R Mio, J Mattioli, E Brais, N Blais, Y Lalonde, M Maragh, and D G Gilliland. 1996. "Nonrandom X-Inactivation Patterns in Normal Females: Lyonization Ratios Vary with Age." *Blood* 88 (1): 59–65. <http://www.bloodjournal.org/content/88/1/59.abstract>.
- C., Cervantes F. · Tassies D. · Salgado C. · Rovira M. · Pereira A. · Rozman. 1991. "Acute Transformation in Nonleukemic Chronic Myeloproliferative Disorders: Actuarial Probability and Main Characteristics in a Series of 218 Patients." *Acta Haematol* 85: 124–127.
- Carette, Jan E, Jan Pruszk, Malini Varadarajan, Vincent a Blomen, Sumita Gokhale, Fernando D Camargo, Marius Wernig, Rudolf Jaenisch, and Thijn R Brummelkamp. 2010. "Brief Report Generation of iPSCs from Cultured Human Malignant Cells." *Blood* 115 (20): 4039–42. doi:10.1182/blood-2009-07-231845.
- Carey, Alyssa, David K. Edwards, Christopher A. Eide, Laura Newell, Elie Traer, Bruno C. Medeiros, Daniel A. Pollyea, et al. 2017. "Identification of Interleukin-1 by Functional Screening as a Key Mediator of Cellular Expansion and Disease Progression in Acute Myeloid Leukemia." *Cell Reports* 18 (13). Elsevier Company.: 3204–18. doi:10.1016/j.celrep.2017.03.018.
- Casadevall, N, W Vainchenker, C Lacombe, G Vinci, J Chapman, J Breton-Gorius, and B Varet. 1982. "Erythroid Progenitors in Polycythemia Vera: Demonstration of Their Hypersensitivity to Erythropoietin Using Serum Free Cultures." *Blood* 59 (2): 447–51.
- Cazzola, Mario, Matteo G Della Porta, and Luca Malcovati. 2013. "The Genetic Basis of Myelodysplasia and Its Clinical Relevance The Genetic Basis of Myelodysplasia and Its Clinical Relevance." *Blood* 122 (25): 4021–35. doi:10.1182/blood-2013-09-381665.
- Cervera, Nathalie, Raphael Itzykson, Emilie Coppin, Thomas Prebet, Anne Murati, Stevan Legall, Norbert Vey, Eric Solary, Daniel Birnbaum, and Véronique Gelsi-Boyer. 2014. "Gene Mutations Differently Impact the Prognosis of the Myelodysplastic and Myeloproliferative Classes of Chronic Myelomonocytic Leukemia." *American Journal of Hematology* 89 (6): 604–9. doi:10.1002/ajh.23702.
- Chachoua, Ilyas, Christian Pecquet, Mira El-Khoury, Harini Nivarthi, Roxana Irina Albu, Caroline Marty, Vitalina Gryshkova, et al. 2016. "Thrombopoietin Receptor Activation by Myeloproliferative Neoplasm Associated Calreticulin Mutants." *Blood* 127 (10): 1325–35. doi:10.1182/blood-2015-11-681932.
- Chadwick, Kristin, Lisheng Wang, Li Li, Pablo Menendez, Barbara Murdoch, Anne Rouleau, and Mickie Bhatia. 2003. "Cytokines and BMP-4 Promote Hematopoietic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells" 102 (3): 906–15. doi:10.1182/blood-2003-03-0832.Supported.
- Chan, Rebecca J., and Mervin C. Yoder. 2013. "JMML Patient-Derived iPSCs Induce New Hypotheses." *Blood* 121 (24): 4815–17. doi:10.1182/blood-2013-05-500090.
- Chang, Tiffany, Kimberly Krisman, Emily Harding Theobald, Jin Xu, Jon Akutagawa, Jennifer O. Lauchle, Scott Kogan, Benjamin S. Braun, and Kevin Shannon. 2013. "Sustained MEK Inhibition Abrogates Myeloproliferative Disease in Nf1 Mutant Mice." *Journal of Clinical Investigation* 123 (1): 335–39. doi:10.1172/JCI63193.
- Chao, Mark P., Andrew J. Gentles, Susmita Chatterjee, Feng Lan, Andreas Reinisch, M. Ryan Corces, Seethu Xavy, et al. 2017. "Human AML-iPSCs Recacquire Leukemic Properties after Differentiation and Model Clonal Variation of Disease." *Cell Stem Cell* 20 (3). Elsevier Inc.: 329–344.e7. doi:10.1016/j.stem.2016.11.018.
- Chen, Qiang, Yibin Chen, Chunjing Bian, Ryoji Fujiki, and Xiaochun Yu. 2013. "TET2 Promotes Histone O-GlcNAcylation during Gene Transcription." *Nature* 493 (7433): 561–64. doi:10.1038/nature11742.
- Cherfils, J., and M. Zeghouf. 2013. "Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs." *Physiological Reviews* 93 (1): 269–309. doi:10.1152/physrev.00003.2012.
- Chesnais, Virginie, Aline Renneville, Andrea Toma, Jérôme Lambert, Marie Passet, Florent Dumont, Sylvie Chevret, et al. 2016. "Effect of Lenalidomide Treatment on Clonal Architecture of Myelodysplastic Syndromes without 5q Deletion." *Blood* 127 (6): 749–60. doi:10.1182/blood-2015-04-640128.
- Chiappinelli, Katherine B., Pamela L. Strissel, Alexis Desrichard, Huili Li, Christine Henke, Benjamin Akman, Alexander Hein, et al. 2015. "Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses." *Cell* 162 (5): 974–86. doi:10.1016/j.cell.2015.07.011.



- Cleary, Allison S., Travis L. Leonard, Shelley A. Gestl, and Edward J. Gunther. 2014. "Tumour Cell Heterogeneity Maintained by Cooperating Subclones in Wnt-Driven Mammary Cancers." *Nature* 508 (7494). Nature Publishing Group: 113–17. doi:10.1038/nature13187.
- Colla, Simona, Derrick Sek Tong Ong, Yamini Ogoti, Matteo Marchesini, Nipun A. Mistry, Karen Clise-Dwyer, Sonny A. Ang, et al. 2015. "Telomere Dysfunction Drives Aberrant Hematopoietic Differentiation and Myelodysplastic Syndrome." *Cancer Cell* 27 (5). Elsevier Inc.: 644–57. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.007.
- Corces-Zimmerman, M. R., W.-J. Hong, I. L. Weissman, B. C. Medeiros, and R. Majeti. 2014. "Preleukemic Mutations in Human Acute Myeloid Leukemia Affect Epigenetic Regulators and Persist in Remission." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (7): 2548–53. doi:10.1073/pnas.1324297111.
- Corominas-Faja, Bruna, Silvia Cufi, Cristina Oliveras-Ferraro, Elisabet Cuyas, Eugeni Lopez-Bonet, Ruth Lupu, Tomas Alarcon, et al. 2013. "Nuclear Reprogramming of Luminal-like Breast Cancer Cells Generates Sox2-Overexpressing Cancer Stem-like Cellular States Harboring Transcriptional Activation of the mTOR Pathway." *Cell Cycle* 12 (18): 3109–24. doi:10.4161/cc.26173.
- Costa, Yael, Junjun Ding, Thorold W. Theunissen, Francesco Faiola, Timothy A. Hore, Pavel V. Shliha, Miguel Fidalgo, et al. 2013. "NANOG-Dependent Function of TET1 and TET2 in Establishment of Pluripotency." *Nature* 495 (7441): 370–74. doi:10.1038/nature11925.
- Cox, David Benjamin Turitz, Randall Jeffrey Platt, and Feng Zhang. 2015. "Therapeutic Genome Editing: Prospects and Challenges." *Nature Medicine* 21 (2). Nature Publishing Group: 121–31. doi:10.1038/nm.3793.
- Cozzio, Antonio, Emmanuelle Passegué, Michael L Cleary, and Irving L Weissman. 2003. "Research Communication." *Genes & Development*, no. 650: 3029–35. doi:10.1101/gad.1143403.GENES.
- Cross, Nicholas C P. 2011. "Genetic and Epigenetic Complexity in Myeloproliferative Neoplasms." *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2011 (1): 208–14. doi:10.1182/asheducation-2011.1.208.
- da Silva-Coelho, Pedro, Leonie I. Kroeze, Kenichi Yoshida, Theresia N. Koorenhof-Scheele, Ruth Knops, Louis T. van de Loch, Aniek O. de Graaf, et al. 2017. "Clonal Evolution in Myelodysplastic Syndromes." *Nature Communications* 8. Nature Publishing Group: 15099. doi:10.1038/ncomms15099.
- Damm, F, F Nguyen-Khac, M Fontenay, and O a Bernard. 2012. "Spliceosome and Other Novel Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia and Myeloid Malignancies." *Leukemia* 26 (9). Nature Publishing Group: 2027–31. doi:10.1038/leu.2012.86.
- Damm, Frederik, Virginie Chesnais, Yasunobu Nagata, Kenichi Yoshida, Laurianne Scourzic, Raphael Itzykson, Masashi Sanada, et al. 2013. "BCOR and BCORL1 Mutations in Myelodysplastic Syndromes and Related Disorders MYELOID NEOPLASIA BCOR and BCORL1 Mutations in Myelodysplastic Syndromes and Related Disorders." *Blood* 122 (18): 3169–77. doi:10.1182/blood-2012-11-469619.
- Daubner, Gerrit M, Antoine Cléry, Sandrine Jayne, James Stevenin, and Frédéric H-T Allain. 2012. "A Syn - Anti Conformational Difference Allows SRSF2 to Recognize Guanines and Cytosines Equally Well." *The EMBO Journal* 31 (1): 162–74. doi:10.1038/emboj.2011.367.
- David, Charles J., and James L. Manley. 2010. "Alternative Pre-mRNA Splicing Regulation in Cancer: Pathways and Programs Unhinged." *Genes and Development* 24 (21): 2343–64. doi:10.1101/gad.1973010.
- David, Laurent, and Calley L. Hirsch. 2014. "How Tets and Cytoskeleton Dynamics MET in Reprogramming." *Cell Stem Cell* 14 (4). Elsevier Inc.: 417–18. doi:10.1016/j.stem.2014.03.007.
- De Los Angeles, Alejandro, Francesco Ferrari, Ruibin Xi, Yuko Fujiwara, Nissim Benvenisty, Hongkui Deng, Konrad Hochedlinger, et al. 2015. "Corrigendum: Hallmarks of Pluripotency." *Nature* 531 (7594): 400–400. doi:10.1038/nature16470.
- Deininger, Michael W N, Jeffrey W Tyner, and Eric Solary. 2017. "Turning the Tide in Myelodysplastic/myeloproliferative Neoplasms." *Nat Rev Cancer* 17 (7). Nature Publishing Group: 425–40. doi:10.1038/nrc.2017.40.
- Delhommeau, François, Sabrina Dupont, Véronique Della Valle, Chloé James, Severine Trannoy, Aline Massé, Olivier Pharm Kosmider, Jean-pierre Le Coedic, Fabienne Robert, and Antonio Alberdi. 2009. "Mutation in TET2 in Myeloid Cancers." *N Engl J Med* 360 (22): 2289–2301.
- Deplus, Rachel, Benjamin Delatte, Marie K Schwinn, Matthieu Defrance, Jacqui Méndez, Nancy Murphy, Mark A Dawson, et al. 2013. "TET2 and TET3 Regulate GlcNAcylation and H3K4 Methylation through OGT and SET1/COMPASS." *The EMBO Journal* 32 (5): 645–55. doi:10.1038/emboj.2012.357.
- Diesch, Jeannine, Anabel Zwick, Anne-Kathrin Garz, Anna Palau, Marcus Buschbeck, and Katharina S. Götze. 2016. "A Clinical-Molecular Update on Azanucleoside-Based Therapy for the Treatment of Hematologic Cancers." *Clinical Epigenetics* 8 (1). Clinical Epigenetics: 71. doi:10.1186/s13148-016-0237-y.
- Ding, Li, Tj Ley, De Larson, and Ca Miller. 2012. "Clonal Evolution in Relapsed Acute Myeloid Leukemia Revealed by Whole Genome Sequencing." *Nature* 481 (7382): 506–10. doi:10.1038/nature10738.Clonal.
- Doege, Claudia A., Keiichi Inoue, Toru Yamashita, David B. Rhee, Skylar Travis, Ryosuke Fujita, Paolo Guarnieri, et al. 2012. "Early-Stage Epigenetic Modification during Somatic Cell Reprogramming by Parp1 and Tet2." *Nature* 488 (7413). Nature Publishing Group: 652–55. doi:10.1038/nature11333.
- Dong, Lei, Wen-Mei Yu, Hong Zheng, Mignon L. Loh, Silvia T. Bunting, Melinda Pauly, Gang Huang, et al. 2016. "Leukaemogenic Effects of Ptpn11 Activating Mutations in the Stem Cell Microenvironment." *Nature* 539 (7628). Nature Publishing Group: 304–8. doi:10.1038/nature20131.
- Doulatov, Sergei, Faiyaz Notta, Kolja Eppert, Linh T Nguyen, Pamela S Ohashi, and John E Dick. 2010. "Revised Map of the Human Progenitor Hierarchy Shows the Origin of Macrophages and Dendritic Cells in Early Lymphoid Development." *Nature Immunology* 11 (7). Nature Publishing Group: 585–93. doi:10.1038/ni.1889.
- Doulatov, Sergei, Linda T. Vo, Stephanie S. Chou, Peter G. Kim, Natasha Arora, Hu Li, Brandon K. Hadland, et al. 2013. "Induction of Multipotential Hematopoietic Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells via Respecification of Lineage-Restricted Precursors." *Cell Stem Cell* 13 (4): 459–70. doi:10.1016/j.stem.2013.09.002.
- Droin, Nathalie, Raphael Itzykson, Philippe Rameau, Margot Morabito, Thorsten Braun, Fawzia Louache, Yanyan Zhang, et al. 2010.



- "Myeloid-Derived Suppressive Cells Belonging to the Leukemic Clone Account for Immunosuppression in CMML." In *Blood ASH Ann Meet*.
- Droin, Nathalie, Arnaud Jacquet, Jean Baptiste Hendra, Cindy Racœur, Caroline Truntzer, Delphine Pecqueur, Naïma Benikhlef, et al. 2010. "Alpha-Defensins Secreted by Dysplastic Granulocytes Inhibit the Differentiation of Monocytes in Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Blood* 115 (1): 78–88. doi:10.1182/blood-2009-05-224352.
- Duffy, Michelle M, Thomas Ritter, Rhodri Ceredig, and Matthew D Griffin. 2011. "Mesenchymal Stem Cell Effects on T-Cell Effector Pathways." *Stem Cell Research & Therapy* 2 (34): 1–9.
- Dupont, Sabrina, Aline Masse, Patrick Saulnier, Serge Koscielny, Jean Pierre, Le Coue, Nicole Casadevall, and William Vainchenker. 2007. "The JAK2 617V > F Mutation Triggers Erythropoietin Hypersensitivity and Terminal Erythroid Amplification in Primary Cells from Patients with Polycythemia Vera." *Hematology* 110 (3): 1013–21. doi:10.1182/blood-2006-10-054940.
- Dvinge, Heidi, Eunhee Kim, Omar Abdel-Wahab, and Robert K. Bradley. 2016. "RNA Splicing Factors as Oncoproteins and Tumour Suppressors." *Nature Reviews Cancer* 16 (7). Nature Publishing Group: 413–30. doi:10.1038/nrc.2016.51.
- Egan, Jan B., Chang Xin Shi, Waibhav Tembe, Alexis Christoforides, Ahmet Kurdoglu, Shripad Sinari, Sumit Middha, et al. 2012. "Whole-Genome Sequencing of Multiple Myeloma from Diagnosis to Plasma Cell Leukemia Reveals Genomic Initiating Events, Evolution, and Clonal Tides." *Blood* 120 (5): 1060–66. doi:10.1182/blood-2012-01-405977.
- Eissa, Hesham, Ted A. Gooley, Mohamed L. Sorrow, Franchesca Nguyen, Bart L. Scott, Kristine Doney, Keith R. Loeb, et al. 2011. "Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Chronic Myelomonocytic Leukemia: Relapse-Free Survival Is Determined by Karyotype and Comorbidities." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17 (6). Elsevier Ltd: 908–15. doi:10.1016/j.bbmt.2010.09.018.
- Elcheva, Irina, Vera Brok-Volchanskaya, Akhilesh Kumar, Patricia Liu, Jeong-Hee Lee, Lilian Tong, Maxim Vodyanik, et al. 2014. "Direct Induction of Haematoendothelial Programs in Human Pluripotent Stem Cells by Transcriptional Regulators." *Nature Communications* 5. Nature Publishing Group: 1–11. doi:10.1038/ncomms5372.
- Elf, Shannon, Nouran S Abdelfattah, Edwin Chen, A Emily, Amy Ko, Fabian Peisker, Natalie Florescu, et al. 2017. "Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-Terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation." *Cancer Discovery* 6 (4): 368–81. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1434.Mutant.
- Ernst, Thomas, Andrew J Chase, Joanna Score, Claire E Hidalgo-Curtis, Catherine Bryant, Amy V Jones, Katherine Waghorn, et al. 2010. "Inactivating Mutations of the Histone Methyltransferase Gene EZH2 in Myeloid Disorders." *Nature Genetics* 42 (8). Nature Publishing Group: 722–26. doi:10.1038/ng.621.
- Ernst, Thomas, Andrew Chase, Katerina Zoi, Katherine Waghorn, Claire Hidalgo-Curtis, Joanna Score, Amy Jones, et al. 2010. "Transcription Factor Mutations in Myelodysplastic/myeloproliferative Neoplasms." *Haematologica* 95 (9): 1473–80. doi:10.3324/haematol.2010.021808.
- Etchegaray, Jean-Pierre, Lukas Chavez, Yun Huang, Kenneth N. Ross, Jiho Choi, Barbara Martinez-Pastor, Ryan M. Walsh, et al. 2015. "The Histone Deacetylase SIRT6 Controls Embryonic Stem Cell Fate via TET-Mediated Production of 5-Hydroxymethylcytosine." *Nature Cell Biology* 17 (5): 545–57. doi:10.1038/ncb3147.
- Evans, MJ, and MH Kaufman. 1981. "Establishment In Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos." *Nature* 292 (5819): 154–56.
- Ferrer, Ruben A., Manja Wobus, Catrin List, Rebekka Wehner, Claudia Schönefeldt, Barbara Brocard, Brigitte Mohr, et al. 2013. "Mesenchymal Stromal Cells from Patients with Myelodysplastic Syndrome Display Distinct Functional Alterations That Are Modulated by Lenalidomide." *Haematologica* 98 (11): 1677–85. doi:10.3324/haematol.2013.083972.
- Fialkow, Philip J. 1974. "The Origin and Development of Human Tumors Studied with Cell Markers." *N Engl J Med*, no. 291: 26–35.
- Figueroa, Maria E, Lucy Skrabanek, Yushan Li, Anchalee Jiemjit, Tamer E Fandy, Elisabeth Paietta, Hugo Fernandez, et al. 2009. "MDS and Secondary AML Display Unique Patterns and Abundance of Aberrant DNA Methylation." *Blood* 114 (16): 3448–58. doi:10.1182/blood-2009-01-200519.
- Fiordalisi, James J., Ronald L. Johnson, Carolyn A. Weinbaum, Kaoru Sakabe, Zhui Chen, Patrick J. Casey, and Adrienne D. Cox. 2003. "High Affinity for Farnesyltransferase and Alternative Prenylation Contribute Individually to K-Ras4B Resistance to Farnesyltransferase Inhibitors." *Journal of Biological Chemistry* 278 (43): 41718–27. doi:10.1074/jbc.M305733200.
- Fu, Xiang-Dong, and Manuel Ares. 2014. "Context-Dependent Control of Alternative Splicing by RNA-Binding Proteins." *Nature Reviews Genetics* 15 (10). Nature Publishing Group: 689–701. doi:10.1038/nrg3778.
- Fuster, José J., Susan MacLauchlan, María A. Zuriaga, Maya N. Polackal, Allison C. Ostriker, Raja Chakraborty, Chia-Ling Wu, et al. 2017. "Clonal Hematopoiesis Associated with TET2 Deficiency Accelerates Atherosclerosis Development in Mice." *Science* 355 (February): 842–47. doi:10.1126/science.aag1381.
- Fütterer, Agnes, Miguel R. Campanero, Esther Leonardo, Luis M. Criado, Juana M. Flores, Jesús M. Hernández, Jesus F. San Miguel, and Carlos Martínez-A. 2005. "Dido Gene Expression Alterations Are Implicated in the Induction of Hematological Myeloid Neoplasms." *Journal of Clinical Investigation* 115 (9): 2351–62. doi:10.1172/JCI24177.
- Gale, Re, H Wheadon, and DC Linch. 1992. "Assessment of X-Chromosome Inactivation Patterns Using the Hypervariable Probe M27 Beta in Normal Hemopoietic Cells and Acute Myeloid Leukemic Blasts." *Leukemia* 6 (7): 649–55.
- Gandre-Babbe, Shilpa, Prasuna Paluru, Chiaka Aribéana, Stella T. Chou, Silvia Bresolin, Lin Lu, Spencer K. Sullivan, et al. 2013. "Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Hematopoietic Abnormalities of Juvenile Myelomonocytic Leukemia." *Blood* 121 (24): 4925–29. doi:10.1182/blood-2013-01-478412.
- Gao, Yawei, Jiayu Chen, Ke Li, Tong Wu, Bo Huang, Wenqiang Liu, Xiaochen Kou, et al. 2013. "Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC Induction Reveals an Important Role of DNA Methylation and Hydroxymethylation in Reprogramming." *Cell Stem Cell* 12 (4): 453–69. doi:10.1016/j.stem.2013.02.005.
- Garber, Ken. 2015. "RIKEN Suspends First Clinical Trial Involving Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature Biotechnology* 33 (9). Nature Publishing Group: 890–91. doi:10.1038/nbt0915-890.
- García-Fernández, María, and Simón Méndez-Ferrer. 2016. "Under Pressure: When a Transformed Environment Pushes Cells to



- Malignancy." *Cell Stem Cell* 19 (5): 559–60. doi:10.1016/j.stem.2016.10.012.
- Garcia-Manero, Guillermo, Pierre Fenaux, Aref Al-Kali, Maria R. Baer, Mikkael A. Sekeres, Gail J. Roboz, Gianluca Gaidano, et al. 2016. "Rigosertib versus Best Supportive Care for Patients with High-Risk Myelodysplastic Syndromes after Failure of Hypomethylating Drugs (ONTIME): A Randomised, Controlled, Phase 3 Trial." *The Lancet Oncology* 17 (4). Elsevier Ltd: 496–508. doi:10.1016/S1470-2045(16)00009-7.
- Garrison, Brian S., and Derrick J. Rossi. 2012. "Reactive Oxygen Species Resulting from Mitochondrial Mutation Diminishes Stem and Progenitor Cell Function." *Cell Metabolism* 15 (1). Elsevier Inc.: 2–3. doi:10.1016/j.cmet.2011.12.008.
- Geissler, K, E Jäger, A Barna, T Alendar, E Ljubuncic, T Sliwa, and P Valent. 2016. "Chronic Myelomonocytic Leukemia Patients with RAS Pathway Mutations Show High in Vitro Myeloid Colony Formation in the Absence of Exogenous Growth Factors." *Leukemia* 30 (11): 2280–81. doi:10.1038/leu.2016.235.
- Gelsi-Boyer, Véronique, Virginie Trouplin, José Adélaïde, Nicola Aceto, Virginie Remy, Stephane Pinson, Claude Houdayer, et al. 2008. "Genome Profiling of Chronic Myelomonocytic Leukemia: Frequent Alterations of RAS and RUNX1genes." *BMC Cancer* 8 (1): 299. doi:10.1186/1471-2407-8-299.
- Genovese, Giulio, Anna K. Kähler, Robert E. Handsaker, Johan Lindberg, Samuel A. Rose, Samuel F. Bakhoun, Kimberly Chambert, et al. 2014. "Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence." *New England Journal of Medicine* 371 (26): 2477–87. doi:10.1056/NEJMoa1409405.
- Gerlinger, Marco, Stuart Horswell, James Larkin, Andrew J Rowan, Max P Salm, Ignacio Varela, Rosalie Fisher, et al. 2014. "Genomic Architecture and Evolution of Clear Cell Renal Cell Carcinomas Defined by Multiregion Sequencing." *Nature Genetics* 46 (3). Nature Publishing Group: 225–33. doi:10.1038/ng.2891.
- Gerlinger, Marco, Andrew J. Rowan, Stuart Horswell, M.Math., James Larkin, David Endesfelder, Dip.Math, et al. 2012. "Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing." *N Engl J Med* 366 (20): 1859–69. doi:10.1056/NEJMoa1208410.
- Geyh, S, S Öz, R-P Cadeddu, J Fröbel, B Brückner, A Kündgen, R Fenk, et al. 2013. "Insufficient Stromal Support in MDS Results from Molecular and Functional Deficits of Mesenchymal Stromal Cells." *Leukemia* 27 (9): 1841–51. doi:10.1038/leu.2013.193.
- Godfrey, Anna L., Edwin Chen, Francesca Pagano, Christina A. Ortmann, Yvonne Silber, Beatriz Bellosillo, Paola Guglielmelli, et al. 2012. "JAK2V617F Homozygosity Arises Commonly and Recurrently in PV and ET, but PV Is Characterized by Expansion of a Dominant Homozygous Subclone." *Blood* 120 (13): 2704–7. doi:10.1182/blood-2012-05-431791.
- Goodwin, Charles B., Xing Jun Li, Raghuvver S. Mali, Gordon Chan, Michelle Kang, Ziyue Liu, Bart Vanhaesebroeck, et al. 2014. "PI3K p110 δ Uniquely Promotes Gain-of-Function Shp2-Induced GM-CSF Hypersensitivity in a Model of JMML." *Blood* 123 (18): 2838–42. doi:10.1182/blood-2013-10-535104.
- Goyama, Susumu, Mark Wunderlich, and James C Mulloy. 2015. "Xenograft Models for Normal and Malignant Stem Cells." *Hematopoietic Stem Cells* 125 (17): 2630–41. doi:10.1182/blood-2014-11-570218.way.
- Graubert, Timothy A, Dong Shen, Li Ding, Theresa Okeyo-Owuor, Cara L Lunn, Jin Shao, Kilannin Krysiak, et al. 2011. "Recurrent Mutations in the U2AF1 Splicing Factor in Myelodysplastic Syndromes." *Nature Genetics* 44 (1). Nature Publishing Group: 53–57. doi:10.1038/ng.1031.
- Graveley, Brenton R, and Tom Maniatis. 1998. "Arginine / Serine-Rich Domains of SR Proteins Can Function as Activators of Pre-mRNA Splicing." *Molecular Cell* 1: 765–71.
- Greaves, Mel, and Carlo C. Maley. 2012. "Clonal Evolution in Cancer." *Nature* 481 (7381): 306–13. doi:10.1038/nature10762.
- Grover, Amit, Alejandra Sanjuan-Pla, Supat Thongjuea, Joana Carrelha, Alice Giustacchini, Adriana Gambardella, Iain Macaulay, et al. 2016. "Single-Cell RNA Sequencing Reveals Molecular and Functional Platelet Bias of Aged Haematopoietic Stem Cells." *Nature Communications* 7: 11075. doi:10.1038/ncomms11075.
- Guièze, Romain, and Catherine J. Wu. 2015. "Genomic and Epigenomic Heterogeneity in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Blood* 126 (4): 445–53. doi:10.1182/blood-2015-02-585042.
- Gundem, Gunes, Peter Van Loo, Barbara Kremeyer, Ludmil B. Alexandrov, Jose M. C. Tubio, Elli Papaemmanuil, Daniel S. Brewer, et al. 2015. "The Evolutionary History of Lethal Metastatic Prostate Cancer." *Nature* 520 (7547): 353–57. doi:10.1038/nature14347.
- Guru Murthya, Subramanian Guru, Shwori Dhakalb, and Paulette Mehtac. 2017. "Incidence and Survival of Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) in the United States (US)." *J Clin Oncol* 58 (7): 1648–54. doi:10.1080/10428194.2016.1258700.
- Haddad, Rodrigo, and Felipe Saldanha-Araujo. 2014. "Mechanisms of T-Cell Immunosuppression by Mesenchymal Stromal Cells: What Do We Know so Far?" *BioMed Research International* 2014. doi:10.1155/2014/216806.
- Haferlach, T, Y Nagata, V Grossmann, Y Okuno, U Bacher, G Nagae, S Schnittger, et al. 2014. "Landscape of Genetic Lesions in 944 Patients with Myelodysplastic Syndromes." *Leukemia* 28 (2). Nature Publishing Group: 241–47. doi:10.1038/leu.2013.336.
- Han, J., J.-H. Ding, C. W. Byeon, J. H. Kim, K. J. Hertel, S. Jeong, and X.-D. Fu. 2011. "SR Proteins Induce Alternative Exon Skipping through Their Activities on the Flanking Constitutive Exons." *Molecular and Cellular Biology* 31 (4): 793–802. doi:10.1128/MCB.01117-10.
- Hanoun, Maher, Dachuan Zhang, Toshihide Mizoguchi, Sandra Pinho, Halley Pierce, Yuya Kunisaki, Julie Lacombe, Scott A. Armstrong, Ulrich Dührsen, and Paul S. Frenette. 2014. "Acute Myelogenous Leukemia-Induced Sympathetic Neuropathy Promotes Malignancy in an Altered Hematopoietic Stem Cell Niche." *Cell Stem Cell* 15 (3): 365–75. doi:10.1016/j.stem.2014.06.020.
- Hao, Jia-Jie, De-Chen Lin, Huy Q Dinh, Anand Mayakonda, Yan-Yi Jiang, Chen Chang, Ye Jiang, et al. 2016. "Spatial Intratumoral Heterogeneity and Temporal Clonal Evolution in Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *Nature Genetics* 48 (12): 1500–1507. doi:10.1038/ng.3683.
- Hasan, S, B Cassinat, N Droin, J P Le Couedic, F Favale, B Monte-Mor, C Lacout, et al. 2013. "Use of the 46/1 Haplotype to Model JAK2V617F Clonal Architecture in PV Patients: Clonal Evolution and Impact of IFN α Treatment." *Leukemia* 28 (2): 460–63. doi:10.1038/leu.2013.303.



- Hatfield, Kimberley, Anne M Øyan, Elisabeth Ersvaer, Karl-Henning Kalland, Philippe Lassalle, Bjørn T Gjertsen, and Øystein Bruserud. 2009. "Primary Human Acute Myeloid Leukaemia Cells Increase the Proliferation of Microvascular Endothelial Cells through the Release of Soluble Mediators." *British Journal of Haematology* 144 (November): 53–68. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07411.x.
- Hinds, David A., Kimberly E. Barnholt, Ruben A. Mesa, Amy K. Kiefer, Chuong B. Do, Nicholas Eriksson, Joanna L. Mountain, et al. 2016. "Germ Line Variants Predispose to Both JAK2 V617F Clonal Hematopoiesis and Myeloproliferative Neoplasms." *Blood* 128 (8): 1121–28. doi:10.1182/blood-2015-06-652941.
- Hirose, Sho Ichi, Naoya Takayama, Sou Nakamura, Kazumichi Nagasawa, Kiyosumi Ochi, Shinji Hirata, Satoshi Yamazaki, et al. 2013. "Immortalization of Erythroblasts by c-MYC and BCL-XL Enables Large-Scale Erythrocyte Production from Human Pluripotent Stem Cells." *Stem Cell Reports* 1 (6). The Authors: 499–508. doi:10.1016/j.stemcr.2013.10.010.
- Hirshi, Karen K., Stefania Nicoli, and Kenneth Walsh. 2017. "Hematopoiesis Lineage Tree Uprooted: Every Cell Is a Rainbow." *Developmental Cell* 41 (1). Elsevier Inc.: 7–9. doi:10.1016/j.devcel.2017.03.020.
- Hockemeyer, Dirk, and Rudolf Jaenisch. 2016. "Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing." *Cell Stem Cell* 18 (5). Elsevier Inc.: 573–86. doi:10.1016/j.stem.2016.04.013.
- Horn, Susanne, Adina Figl, P Sivaramakrishna Rachakonda, Christine Fischer, Antje Sucker, Andreas Gast, Stephanie Kadel, et al. 2013. "TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma," no. February: 959–61.
- Hosoi, Masataka, Keiki Kumano, Kazuki Taoka, Shunya Arai, Keisuke Kataoka, Koki Ueda, Yasuhiko Kamikubo, et al. 2014. "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Primary and Secondary Myelofibrosis Patient Samples." *Experimental Hematology* 42 (9). ISEH - International Society for Experimental Hematology: 816–25. doi:10.1016/j.exphem.2014.03.010.
- Hu, Kejin, Junying Yu, Kran Suknuntha, Shulan Tian, Karen Montgomery, Kyung-dal Choi, Ron Stewart, James a Thomson, and Igor I Slukvin. 2011. "Efficient Generation of Transgene-Free Induced Pluripotent Stem Cells from Normal and Neoplastic Bone Marrow and Cord Blood Mononuclear Cells" 117 (14): 109–19. doi:10.1182/blood-2010-07-298331.The.
- Hu, Xiao, Lei Zhang, Shi Qing Mao, Zheng Li, Jiekai Chen, Run Rui Zhang, Hai Ping Wu, et al. 2014. "Tet and TDG Mediate DNA Demethylation Essential for Mesenchymal-to- Epithelial Transition in Somatic Cell Reprogramming." *Cell Stem Cell* 14 (4). Elsevier Inc.: 512–22. doi:10.1016/j.stem.2014.01.001.
- Huelga, Stephanie C., Anthony Q. Vu, Justin D. Arnold, Tiffany D. Liang, Patrick P. Liu, Bernice Y. Yan, John Paul Donohue, et al. 2012. "Integrative Genome-Wide Analysis Reveals Cooperative Regulation of Alternative Splicing by hnRNP Proteins." *Cell Reports* 1 (2). The Authors: 167–78. doi:10.1016/j.celrep.2012.02.001.
- Huntly, Brian J P, Hirokazu Shigematsu, Kenji Deguchi, Benjamin H. Lee, Shinichi Mizuno, Nicky Duclos, Rebecca Rowan, et al. 2004. "MOZ-TIF2, but Not BCR-ABL, Confers Properties of Leukemic Stem Cells to Committed Murine Hematopoietic Progenitors." *Cancer Cell* 6 (6): 587–96. doi:10.1016/j.ccr.2004.10.015.
- Iizuka, Hiromitsu, Yuki Kagoya, Keisuke Kataoka, Akihide Yoshimi, Masashi Miyauchi, Kazuki Taoka, Keiki Kumano, et al. 2015. "Targeted Gene Correction of RUNX1 in Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Familial Platelet Disorder with Propensity to Myeloid Malignancy Restores Normal Megakaryopoiesis." *Experimental Hematology* 43 (10): 849–57.
- Inda, Maria-del-Mar, Rudy Bonavia, Akitake Mukasa, Yoshitaka Narita, Dinah W.Y., Scott Vandenberg, Cameron Brennan, et al. 2010. "Tumor Heterogeneity Is an Active Process Driven By a Mutant Egfr-Induced Paracrine Circuit in Glioblastoma." *Genes & Development*, no. 24: 1731–45. doi:10.1101/gad.1890510.themselves.
- Ito, S., L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, and Y. Zhang. 2011. "Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine." *Science* 333 (6047): 1300–1303. doi:10.1126/science.1210597.
- Itzykson, Raphael, Matthieu Duchmann, Nolwenn Lucas, and Eric Solary. 2017. "CMML: Clinical and Molecular Aspects." *International Journal of Hematology* 105 (6). Springer Japan: 711–19. doi:10.1007/s12185-017-2243-z.
- Itzykson, Raphaël, Olivier Kosmider, Aline Renneville, Véronique Gelsi-Boyer, Manja Meggendorfer, Margot Morabito, Céline Berthon, et al. 2013. "Prognostic Score Including Gene Mutations in Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Journal of Clinical Oncology* 31 (19): 2428–36. doi:10.1200/JCO.2012.47.3314.
- Itzykson, Raphael, Olivier Kosmider, Aline Renneville, Margot Morabito, Dorothee Buet, Claude Preudhomme, Céline Berthon, et al. 2012. "Two Distinct Mechanisms Contribute to Granulomonocytic Hyperplasia in Chronic Myelomonocytic Leukemias (CMML)." *Blood ASH Ann Meet* 120 (21): 309.
- Itzykson, Raphaël, Olivier Kosmider, Aline Renneville, Margot Morabito, Claude Preudhomme, Lionel Adès, Pierre Fenaux, et al. 2013. "Clonal Architecture of Chronic Myelomonocytic Leukemias Plenary Paper Clonal Architecture of Chronic Myelomonocytic Leukemias." *Blood* 121 (12): 2186–98. doi:10.1182/blood-2012-06-440347.
- Itzykson, R, and E Solary. 2013. "An Evolutionary Perspective on Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Leukemia* 27 (7). Nature Publishing Group: 1441–50. doi:10.1038/leu.2013.100.
- Jaiswal, Siddhartha, Pierre Fontanillas, Jason Flannick, Alisa Manning, Peter V. Grauman, Brenton G. Mar, R. Coleman Lindsley, et al. 2014. "Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes." *New England Journal of Medicine* 371 (26): 2488–98. doi:10.1056/NEJMoa1408617.
- Jan, Max, Thomas M Snyder, M. Ryan Corces-Zimmerman, Paresch Vyas, Irving L Weissman, Stephen R Quake, and Ravindra Majeti. 2012. "Clonal Evolution of Preleukemic Hematopoietic Stem Cells Precedes Human Acute Myeloid Leukemia." *Sci Transl Med* 4 (149): 149ra118. doi:10.1126/scitranslmed.3004315.
- Jankowska, A. M., H. Makishima, R. V. Tiu, H. Szpurka, Y. Huang, F. Traina, V. Visconte, et al. 2011. "Mutational Spectrum Analysis of Chronic Myelomonocytic Leukemia Includes Genes Associated with Epigenetic Regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A." *Blood* 118 (14): 3932–41. doi:10.1182/blood-2010-10-311019.
- Jensen, Mads A, John E Wilkinson, and Adrian R Krainer. 2014. "Splicing Factor SRSF6 Promotes Hyperplasia of Sensitized Skin." *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (2). Nature Publishing Group: 189–97. doi:10.1038/nsmb.2756.
- Ji, Xiong, Yu Zhou, Shatakshi Pandit, Jie Huang, Hairi Li, Charles Y. Lin, Rui Xiao, Christopher B. Burge, and Xiang Dong Fu. 2013. "SR Proteins Collaborate with 7SK and Promoter-Associated Nascent RNA to Release Paused Polymerase." *Cell* 153 (4). Elsevier



Inc.: 855–68. doi:10.1016/j.cell.2013.04.028.

- Jia, Rong, Cuiling Li, J. Philip McCoy, Chu Xia Deng, and Zhi Ming Zheng. 2010. "SRp20 Is a Proto-Oncogene Critical for Cell Proliferation and Tumor Induction and Maintenance." *International Journal of Biological Sciences* 6 (7): 806–26. doi:10.7150/ijbs.6.806.
- Jonathan M. Gerber, Brownhilda Ngwang, Hao Zhang, Donna M. Williams, Ophelia Rogers, Richard J. Jones, Alison R. Moliterno and Jerry L. Spivak. 2011. "The Leukemic Stem Cell in Polycythemia Vera and Primary Myelofibrosis Is Distinct From the Initiating JAK2 V617F-Positive Hematopoietic Stem Cell." *Blood* 118 (21): 613.
- Jones, Amy V, Andrew Chase, Richard T Silver, David Oscier, Katerina Zoi, Y Lynn Wang, Holger Cario, et al. 2008. "JAK2 Haplotype Is a Major Risk Factor for the Development of Myeloproliferative Neoplasms." *Nature Genetics* 86 (12): 3279–88. doi:10.1007/s11103-011-9767-z.Plastid.
- Joshi, Poorval, Stephanie Halene, and Omar Abdel-Wahab. 2017. "How Do Messenger RNA Splicing Alterations Drive Myelodysplasia?" *Blood* 129 (18): 2465–70. doi:10.1182/blood-2017-02-692715.
- Karni, Rotem, Elisa de Stanchina, Scott W Lowe, Rahul Sinha, David Mu, and Adrian R Krainer. 2007. "The Gene Encoding the Splicing Factor SF2/ASF Is a Proto-Oncogene." *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (3): 185–93. doi:10.1038/nsmb1209.
- Kelly, S. J. 1977. "Studies of the Developmental Potential of 4- and 8-Cell Stage Blastomeres." *J Exp Zool.* 200 (3): 365–76.
- Kennedy, James A., Eshetu G. Atenafu, Hans A. Messner, Kenneth J. Craddock, Joseph M. Brandwein, Jeffrey H. Lipton, Mark D. Minden, et al. 2013. "Treatment Outcomes Following Leukemic Transformation in Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms." *Blood* 121 (14): 2725–33. doi:10.1182/blood-2012-10-464248.
- Kennedy, Marion, Geneve Awong, Christopher M. Sturgeon, Andrea Ditadi, Ross LaMotte-Mohs, Juan Carlos Zúñiga-Pflücker, and Gordon Keller. 2012. "T Lymphocyte Potential Marks the Emergence of Definitive Hematopoietic Progenitors in Human Pluripotent Stem Cell Differentiation Cultures." *Cell Reports* 2 (6): 1722–35. doi:10.1016/j.celrep.2012.11.003.
- Kerbaudy, Daniella M. Bahia, Vladimir Lesniko, Beverly Torok-Storb, Eileen Bryant, and H. Joachim Deeg. 2017. "Engraftment of Distinct Clonal MDS-Derived Hematopoietic Precursors in NOD/SCID- γ 2- Microglobulin-deficient Mice after Intramedullary Transplantation of Hematopoietic and Stromal Cells." *Blood* 130 (11): 1377–81. doi:10.1182/blood-2017-05-784678.
- Kim, Eunhee, and Omar Abdel-Wahab. 2013. "Focus on the Epigenome in the Myeloproliferative Neoplasms." *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2013: 538–44. doi:10.1182/asheducation-2013.1.538.
- Kim, Eunhee, Janine O Ilgan, Yang Liang, Gerrit M Daubner, Stanley C-W Lee, Aravind Ramakrishnan, Yue Li, et al. 2015. "SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition." *Cancer Cell* 27 (5): 617–30. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.006.
- Kirkeby, Agnete, Sara Nolbrant, Katarina Tiklova, Andreas Heuer, Nigel Kee, Tiago Cardoso, Daniella Rylander Ottosson, et al. 2017. "Predictive Markers Guide Differentiation to Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease." *Cell Stem Cell* 20 (1). Elsevier Inc.: 135–48. doi:10.1016/j.stem.2016.09.004.
- Klco, Jeffery M., David H. Spencer, Christopher A. Miller, Malachi Griffith, Tamara L. Lamprecht, Michelle O'Laughlin, Catrina Fronick, et al. 2014. "Functional Heterogeneity of Genetically Defined Subclones in Acute Myeloid Leukemia." *Cancer Cell* 25 (3). Elsevier Inc.: 379–92. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.031.
- Klimchenko, Olena, Marcella Mori, Antonio DiStefano, Thierry Langlois, Frédéric Larbret, Yann Lecluse, Olivier Feraud, William Vainchenker, Françoise Norol, and Najet Debili. 2009. "A Common Bipotent Progenitor Generates the Erythroid and Megakaryocyte Lineages in Embryonic Stem Cell-Derived Primitive Hematopoiesis." *Blood* 114 (8): 1506–17. doi:10.1182/blood-2008-09-178863.
- Klinakis, Apostolos, Camille Lobry, Omar Abdel-Wahab, Philmo Oh, Hiroshi Haeno, Silvia Buonamici, Inge van De Walle, et al. 2011. "A Novel Tumour-Suppressor Function for the Notch Pathway in Myeloid Leukaemia." *Nature* 473 (7346). Nature Publishing Group: 230–33. doi:10.1038/nature09999.
- Kobayashi, Hideki, Jason M. Butler, Rebekah O'Donnell, Mariko Kobayashi, Bi-Sen Ding, Bryant Bonner, Vi K. Chiu, et al. 2010. "Angiocrine Factors from Akt-Activated Endothelial Cells Balance Self-Renewal and Differentiation of Haematopoietic Stem Cells." *Nature Cell Biology* 12 (11): 1046–56. doi:10.1038/ncb2108.
- Kondo, M, I L Weissman, K Akashi, K. Akashi, I.L. Weissman, K. Akashi, M. Harada, et al. 1997. "Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow." *Cell* 91 (5): 661–72. doi:10.1016/s0092-8674(00)80453-5.
- Kotecha, Nikesh, Nikki J. Flores, Jonathan M. Irish, Erin F. Simonds, Debbie S. Sakai, Sophie Archambeault, Ernesto Diaz-Flores, et al. 2008. "Single-Cell Profiling Identifies Aberrant STAT5 Activation in Myeloid Malignancies with Specific Clinical and Biologic Correlates." *Cancer Cell* 14 (4): 335–43. doi:10.1016/j.ccr.2008.08.014.
- Kotini, Andriana G., Chan Jung Chang, Arthur Chow, Han Yuan, Tzu Chieh Ho, Tiansu Wang, Shailee Vora, et al. 2017. "Stage-Specific Human Induced Pluripotent Stem Cells Map the Progression of Myeloid Transformation to Transplantable Leukemia." *Cell Stem Cell* 20 (3). Elsevier Inc.: 315–328.e7. doi:10.1016/j.stem.2017.01.009.
- Kotini, Andriana G, Chan-Jung Chang, Ibrahim Boussaad, Jeffrey J Delrow, Emily K Dolezal, Abhinav B Nagulapally, Fabiana Perna, et al. 2015. "Functional Analysis of a Chromosomal Deletion Associated with Myelodysplastic Syndromes Using Isogenic Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature Biotechnology* 33 (6): 646–55. doi:10.1038/nbt.3178.
- Krecic, Annette M., and Maurice S. Swanson. 1999. "hnRNP Complexes: Composition, Structure, and Function." *Current Opinion in Cell Biology* 11 (3): 363–71. doi:10.1016/S0955-0674(99)80051-9.
- Krönke, Jan, Lars Bullinger, Veronica Tleanu, Florian Tsch, Verena I Gaidzik, W M K Michael, G R Frank, et al. 2013. "Clonal Evolution in Relapsed NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia Jan." *Blood* 122 (1): 100–109. doi:10.1182/blood-2013-01-479188.The.
- Krueger, Felix, and Simon R. Andrews. 2011. "Bismark: A Flexible Aligner and Methylation Caller for Bisulfite-Seq Applications." *Bioinformatics* 27 (11): 1571–72. doi:10.1093/bioinformatics/btr167.
- Landau, Dan A., Scott L. Carter, Petar Stojanov, Aaron McKenna, Kristen Stevenson, Michael S. Lawrence, Carrie Sougnez, et al. 2013. "Evolution and Impact of Subclonal Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Cell* 152 (4). Elsevier Inc.: 714–26.



doi:10.1016/j.cell.2013.01.019.

- Landau, Dan A., Kendell Clement, Michael J. Ziller, Patrick Boyle, Jean Fan, Hongcang Gu, Kristen Stevenson, et al. 2014. "Locally Disordered Methylation Forms the Basis of Intratumor Methylome Variation in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Cancer Cell* 26 (6): 813–25. doi:10.1016/j.ccell.2014.10.012.
- Landau, Dan A., Eugen Tausch, Amaro N. Taylor-Weiner, Chip Stewart, Johannes G. Reiter, Jasmin Bahlo, Sandra Kluth, et al. 2015. "Mutations Driving CLL and Their Evolution in Progression and Relapse." *Nature* 526 (7574): 525–30. doi:10.1038/nature15395.
- Lasho, T L, A Tefferi, C Finke, and A Pardanani. 2011. "Clonal Hierarchy and Allelic Mutation Segregation in a Myelofibrosis Patient with Two Distinct LNK Mutations." *Leukemia* 25 (6): 1056–58. doi:10.1038/leu.2011.45.
- Laurenti, Elisa, Sergei Doulatov, Sasan Zandi, Ian Plumb, Jing Chen, Craig April, Jian-Bing Fan, and John E Dick. 2013. "The Transcriptional Architecture of Early Human Hematopoiesis Identifies Multilevel Control of Lymphoid Commitment." *Nature Immunology* 14 (7): 756–63. doi:10.1038/ni.2615.
- Ledran, Maria H., Anna Krassowska, Lyle Armstrong, Ian Dimmick, Jonas Renstr??m, Roland Lang, Sun Yung, et al. 2008. "Efficient Hematopoietic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells on Stromal Cells Derived from Hematopoietic Niches." *Cell Stem Cell* 3 (1): 85–98. doi:10.1016/j.stem.2008.06.001.
- Lee, Benjamin H., Zuzana Tothova, Ross L. Levine, Kristina Anderson, Natalija Buza-Vidas, Dana E Cullen, Elizabeth P. McDowell, et al. 2007. "FLT3 Mutations Confer Enhanced Proliferation and Survival Properties to Multipotent Progenitors in a Murine Model of Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Cancer Cell* 12 (4): 367–80. doi:10.1016/j.ccr.2007.08.031.
- Lee, Stanley Chun-Wei, and Omar Abdel-Wahab. 2016. "Therapeutic Targeting of Splicing in Cancer." *Nature Medicine* 22 (9): 976–86. doi:10.1038/nm.4165.
- Lee, Stanley Chun-Wei, Heidi Dvinge, Eunhee Kim, Hana Cho, Jean-Baptiste Micol, Young Rock Chung, Benjamin H Durham, et al. 2016. "Modulation of Splicing Catalysis for Therapeutic Targeting of Leukemia with Mutations in Genes Encoding Spliceosomal Proteins." *Nature Medicine* 22 (6): 672–78. doi:10.1038/nm.4097.
- Li, Mingfen, Xuyong Sun, Xiacong Kuang, Yan Liao, Haibin Li, and Dianzhong Luo. 2014. "Mesenchymal Stem Cells Suppress CD8+ T Cell-Mediated Activation by Suppressing Natural Killer Group 2, Member D Protein Receptor Expression and Secretion of Prostaglandin E2, Indoleamine 2, 3-Dioxygenase and Transforming Growth Factor-??" *Clinical and Experimental Immunology* 178 (3): 516–24. doi:10.1111/cei.12423.
- Li, Sheng, Francine E Garrett-Bakelman, Stephen S Chung, Mathijs A Sanders, Todd Hricik, Franck Rapaport, Jay Patel, et al. 2016. "Distinct Evolution and Dynamics of Epigenetic and Genetic Heterogeneity in Acute Myeloid Leukemia." *Nature Medicine* 22 (7): 792–99. doi:10.1038/nm.4125.
- Li, X, A M Marcondes, T Ragoczy, A Telling, and H J Deeg. 2013. "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* 3 (4): e113. doi:10.1038/bcj.2013.11.
- Li, Xialu, and James L. Manley. 2005. "Inactivation of the SR Protein Splicing Factor ASF/SF2 Results in Genomic Instability." *Cell* 122 (3): 365–78. doi:10.1016/j.cell.2005.06.008.
- Li, Zhe, Xiaoqiang Cai, Chen-leng Cai, Jiapeng Wang, Wenyong Zhang, Bruce E Petersen, Washington Dc, and Feng-chun Yang. 2013. "Deletion of Tet2 in Mice Leads to Dysregulated Hematopoietic Stem Cells and Subsequent Development of Myeloid Malignancies." *Blood* 118 (17): 4509–18. doi:10.1182/blood-2010-12-325241.
- Licht, Jonathan D. 2015. "DNA Methylation Inhibitors in Cancer Therapy: The Immunity Dimension." *Cell* 162 (5). Elsevier Inc.: 938–39. doi:10.1016/j.cell.2015.08.005.
- Lim, Jing Shan, Alvaro Ibaseta, Marcus M. Fischer, Belinda Cancilla, Gilbert O'Young, Sandra Cristea, Vincent C. Luca, et al. 2017. "Intratymoural Heterogeneity Generated by Notch Signalling Promotes Small-Cell Lung Cancer." *Nature* 545 (7654). Nature Publishing Group: 360–64. doi:10.1038/nature22323.
- Lis, Raphael, Charles C. Karrasch, Michael G. Poulos, Balvir Kumar, David Redmond, Jose G. Barcia Duran, Chaitanya R. Badwe, et al. 2017. "Conversion of Adult Endothelium to Immunocompetent Haematopoietic Stem Cells." *Nature* 545 (7655). Nature Publishing Group: 439–45. doi:10.1038/nature22326.
- Liu, H X, Shern L Chew, Luca Cartegni, M Q Zhang, and Adrian R Krainer. 2000. "Exonic Splicing Enhancer Motif Recognized by Human SC35 under Splicing Conditions." *Molecular and Cellular Biology* 20 (3): 1063–71. doi:10.1128/MCB.20.3.1063-1071.2000.Updated.
- Llorian, Miriam, Schraga Schwartz, Tyson A Clark, Dror Hollander, Lit-Yeen Tan, Rachel Spellman, Adele Gordon, et al. 2010. "Position-Dependent Alternative Splicing Activity Revealed by Global Profiling of Alternative Splicing Events Regulated by PTB." *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (99). Nature Publishing Group: 1114–23. doi:10.1038/nsmb.1881.
- Long, Jennifer C., and Javier F. Caceres. 2009. "The SR Protein Family of Splicing Factors: Master Regulators of Gene Expression." *Biochemical Journal* 417 (1): 15–27. doi:10.1042/BJ20081501.
- Luz-Crawford, Patricia, Farida Djouad, Karine Toupet, Claire Bony, Marcella Franquesa, Martin J Hoogduijn, Christian Jorgensen, and Daniele Noel. 2016. "Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 34 (2): 483–92. doi:10.1002/stem.2254.
- Maddalo, Danilo, Eusebio Machado, Carla P. Concepcion, Ciro Bonetti, Joana A. Vidigal, Yoon-Chi Han, Paul Ogradowski, et al. 2014. "In Vivo Engineering of Oncogenic Chromosomal Rearrangements with the CRISPR/Cas9 System." *Nature* 516 (7531): 423–27. doi:10.1038/nature13902.
- Madzo, Jozef, Hui Liu, Alexis Rodriguez, Aparna Vasanthakumar, Sriram Sundaravel, Donne Bennett D Caces, Timothy J. Looney, et al. 2014. "Hydroxymethylation at Gene Regulatory Regions Directs Stem/early Progenitor Cell Commitment during Erythropoiesis." *Cell Reports* 6 (1). The Authors: 231–44. doi:10.1016/j.celrep.2013.11.044.
- Maehle, AH. 2011. "AMBIGUOUS CELLS: THE EMERGENCE OF THE STEM CELL CONCEPT IN THE NINETEENTH AND TWENTIETH CENTURIES." *Note & Records of the Royal Society* 23: 1–20. doi:10.1098/rsnr.2011.0023.
- Mahfoudhi, Emna, Lise Secardin, Laurianne Scourzic, Olivier Bernard, William Vainchenker, and Isabelle Plo. 2015. "Propriétés et



- Rôles Biologiques Des Protéines TET Au Cours Du Développement et de L'hématopoïèse." *Medecine/Sciences* 31 (3): 268–74. doi:10.1051/medsci/20153103012.
- Malcovati, Luca, Mohsen Karimi, Elli Papaemmanuil, Ilaria Ambaglio, Martin Jädersten, Monika Jansson, Chiara Elena, et al. 2015. "SF3B1 Mutation Identifies a Distinct Subset of Myelodysplastic Syndrome with Ring Sideroblasts." *Blood* 126 (2): 233–41. doi:10.1182/blood-2015-03-633537.
- Malcovati, Luca, Elli Papaemmanuil, Ilaria Ambaglio, Chiara Elena, Anna Galli, Matteo G. Della Porta, Erica Travaglino, et al. 2014. "Driver Somatic Mutations Identify Distinct Disease Entities within Myeloid Neoplasms with Myelodysplasia." *Blood* 124 (9): 1513–21. doi:10.1182/blood-2014-03-560227.
- Mandai, Michiko, Akira Watanabe, Yasuo Kurimoto, Yasuhiko Hiram, Chikako Morinaga, Takashi Daimon, Masashi Fujihara, et al. 2017. "Autologous Induced Stem-Cell–Derived Retinal Cells for Macular Degeneration." *New England Journal of Medicine* 376 (11): 1038–46. doi:10.1056/NEJMoa1608368.
- Martin, G. R. 1981. "Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (12): 7634–38. doi:10.1073/pnas.78.12.7634.
- Marty, Caroline, Christian Pecquet, Harini Nivarthi, Mira El-Khoury, Ilyas Chachoua, Micheline Tulliez, Jean Luc Villeval, et al. 2016. "Calreticulin Mutants in Mice Induce an MPL-Dependent Thrombocytosis with Frequent Progression to Myelofibrosis." *Blood* 127 (10): 1317–24. doi:10.1182/blood-2015-11-679571.
- Marusyk, Andriy, Doris P. Tabassum, Philipp M. Altrock, Vanessa Almendro, Franziska Michor, and Kornelia Polyak. 2014. "Non-Cell-Autonomous Driving of Tumour Growth Supports Sub-Clonal Heterogeneity." *Nature* 514 (7520). Nature Publishing Group: 54–58. doi:10.1038/nature13556.
- Mason, C C, J S Khorashad, S K Tantravahi, T W Kelley, M S Zabriskie, D Yan, A D Pomictter, et al. 2016. "Age-Related Mutations and Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Leukemia* 30 (4): 906–13. doi:10.1038/leu.2015.337.
- Mass, Elvira, Christian E. Jacome-Galarza, Thomas Blank, Tomi Lazarov, Benjamin H. Durham, Neval Ozkaya, Alessandro Pastore, et al. 2017. "A Somatic Mutation in Erythro-Myeloid Progenitors Causes Neurodegenerative Disease." *Nature* 549 (7672). Nature Publishing Group: 389–93. doi:10.1038/nature23672.
- Matera, A. Gregory, and Zefeng Wang. 2014. "A Day in the Life of the Spliceosome." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (2): 108–21. doi:10.1038/nrm3742.
- Maynadie, Marc, Francois Girodon, Ines Manivet-Janoray, Morgane Mounier, Francine Mugneret, Francois Bailly, Bernardine Favre, et al. 2011. "Twenty-Five Years of Epidemiological Recording on Myeloid Malignancies: Data from the Specialized Registry of Hematologic Malignancies of Cote D'or (Burgundy, France)." *Haematologica* 96 (1): 55–61. doi:10.3324/haematol.2010.026252.
- Mazor, Tali, Aleksandr Pankov, Jun S. Song, and Joseph F. Costello. 2016. "Intratumoral Heterogeneity of the Epigenome." *Cancer Cell* 29 (4). Elsevier Inc.: 440–51. doi:10.1016/j.ccell.2016.03.009.
- McKerrell, Thomas, Naomi Park, Thaidy Moreno, Carolyn S. Grove, Hannes Ponstingl, Jonathan Stephens, Charles Crawley, et al. 2015. "Leukemia-Associated Somatic Mutations Drive Distinct Patterns of Age-Related Clonal Hemopoiesis." *Cell Reports* 10 (8): 1239–45. doi:10.1016/j.celrep.2015.02.005.
- McNally, R. J Q, D. Rowland, E. Roman, and R. A. Cartwright. 1997. "Age and Sex Distributions of Hematological Malignancies in the U.K." *Hematological Oncology* 15 (4): 173–89. doi:10.1002/(SICI)1099-1069(199711)15:4<173::AID-HON610>3.0.CO;2-K.
- Medyouf, Hind. 2017. "The Microenvironment in Human Myeloid Malignancies : Emerging Concepts and Therapeutic Implications" 129 (12): 1617–27. doi:10.1182/blood-2016-11-696070.This.
- Meggendorfer, Manja, Andreas Roller, Torsten Haferlach, Christiane Eder, Frank Dicker, Vera Grossmann, Alexander Kohlmann, et al. 2012. "SRSF2 Mutations in 275 Cases with Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML)." *Blood* 120 (15): 3080–88. doi:10.1182/blood-2012-01-404863.
- Meldi, Kristen, Tingting Qin, Francesca Buchi, Nathalie Droin, Jason Sotzen, Jean-baptiste Micol, Dorothée Selimoglu-buet, et al. 2015. "Specific Molecular Signatures Predict Decitabine Response in Chronic Myelomonocytic Leukemia." *The Journal of Clinical Investigation* 125 (5): 1857–72. doi:10.1172/JCI78752DS1.
- Mendoza, Michelle C., E. Emrah Er, and John Blenis. 2011. "The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-Talk and Compensation." *Trends in Biochemical Sciences* 36 (6). Elsevier Ltd: 320–28. doi:10.1016/j.tibs.2011.03.006.
- Mercier, Francois E., and David T. Scadden. 2015. "Not All Created Equal: Lineage Hard-Wiring in the Production of Blood." *Cell* 163 (7). Elsevier Inc.: 1568–70. doi:10.1016/j.cell.2015.12.013.
- Merlevede, Jane, Nathalie Droin, Tingting Qin, Kristen Meldi, Kenichi Yoshida, Margot Morabito, Emilie Chautard, et al. 2016. "Mutation Allele Burden Remains Unchanged in Chronic Myelomonocytic Leukaemia Responding to Hypomethylating Agents." *Nature Communications* 7: 10767. doi:10.1038/ncomms10767.
- Mikhail, Fady M., Kislay K. Sinha, Yogen Saunthararajah, and Giuseppina Nucifora. 2006. "Normal and Transforming Functions of RUNX1: A Perspective." *Journal of Cellular Physiology* 207 (1): 12–22. doi:10.1002/JCP.
- Mills, Jason A., Prasuna Paluru, Mitchell J. Weiss, Paul Gadue, and Deborah L. French. 2014. "Hematopoietic Differentiation of Pluripotent Stem Cells in Culture." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1185 (6): 321–44. doi:10.1007/978-1-4939-1133-2.
- Mills, Jason a, Kai Wang, Prasuna Paluru, Lei Ying, Lin Lu, Aline M Galvão, Dongbin Xu, et al. 2013. "Clonal Genetic and Hematopoietic Heterogeneity among Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines." *Blood* 122 (12): 2047–52. doi:10.1182/blood-2013-02-484444.
- Mills, Ken I., Alexander Kohlmann, P. Mickey Williams, Lothar Wieczorek, Wei Min Liu, Rachel Li, Wen Wei, et al. 2009. "Microarray-Based Classifiers and Prognosis Models Identify Subgroups with Distinct Clinical Outcomes and High Risk of AML Transformation of Myelodysplastic Syndrome." *Blood* 114 (5): 1063–72. doi:10.1182/blood-2008-10-187203.
- Mitchell, RYAN, EVA Szabo, ZOYA SHAPOVALOVA, LILI ASLOSTOVAR, KENNEDY MAKONDO, and MICKIE BHATIA. 2014. "Molecular Evidence for OCT4 Induced Plasticity in Adult Human Fibroblasts Required for Direct Cell Fate Conversion to Lineage Specific



Pro -," 1–12. doi:10.1002/stem.1721.

- Mitin, Natalia, Kent L. Rossman, and Channing J. Der. 2005. "Signaling Interplay in Ras Superfamily Function." *Current Biology* 15 (14): 563–74. doi:10.1016/j.cub.2005.07.010.
- Miyoshi, N., H. Ishii, K.-i. Nagai, H. Hoshino, K. Mimori, F. Tanaka, H. Nagano, M. Sekimoto, Y. Doki, and M. Mori. 2010. "Defined Factors Induce Reprogramming of Gastrointestinal Cancer Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (1): 40–45. doi:10.1073/pnas.0912407107.
- Moran-Crusio, Kelly, Linsey Reavie, Alan Shih, Omar Abdel-Wahab, Delphine Ndiaye-Lobry, Camille Lobry, Maria E. Figueroa, et al. 2011. "Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation." *Cancer Cell* 20 (1). Elsevier Inc.: 11–24. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.001.
- Mughal, Tariq I., Nicholas C.P. Cross, Eric Padron, Ramon V. Tiu, Michael Savona, Luca Malcovati, Raoul Tibes, et al. 2015. "An International MDS/MPN Working Group's Perspective and Recommendations on Molecular Pathogenesis, Diagnosis and Clinical Characterization of Myelodysplastic/myeloproliferative Neoplasms." *Haematologica* 100 (9): 1117–30. doi:10.3324/haematol.2014.114660.
- Mulero-Navarro, Sonia, Ana Sevilla, Angel C. Roman, Dung-Fang Lee, Sunita L. D'Souza, Sherly Pardo, Ilan Riess, et al. 2015. "Myeloid Dysregulation in a Human Induced Pluripotent Stem Cell Model of PTPN11-Associated Juvenile Myelomonocytic Leukemia." *Cell Reports* 13 (3): 504–15. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.019.
- Müller-Schmah, Claudia, Leticia Solari, Roland Weis, Dietmar Pfeifer, Carmen Scheibenbogen, Martin Trepel, Annette M. May, Rupert Engelhardt, and Michael Lübbert. 2012. "Immune Response as a Possible Mechanism of Long-Lasting Disease Control in Spontaneous Remission of MLL/AF9-Positive Acute Myeloid Leukemia." *Annals of Hematology* 91 (1): 27–32. doi:10.1007/s00277-011-1332-y.
- Muto, Tomoya, Goro Sashida, Motohiko Oshima, George R. Wendt, Makiko Mochizuki-Kashio, Yasunobu Nagata, Masashi Sanada, et al. 2013. "Concurrent Loss of *Ezh2* and *Tet2* Cooperates in the Pathogenesis of Myelodysplastic Disorders." *The Journal of Experimental Medicine* 210 (12): 2627–39. doi:10.1084/jem.20131144.
- Naik, Shalin H., Leila Perié, Erwin Swart, Carmen Gerlach, Nienke van Rooij, Rob J. de Boer, and Ton N. Schumacher. 2013. "Diverse and Heritable Lineage Imprinting of Early Haematopoietic Progenitors." *Nature* 496 (7444): 229–32. doi:10.1038/nature12013.
- Nakamura, Sou, Naoya Takayama, Shinji Hirata, Hideya Seo, Hiroshi Endo, Kiyosumi Ochi, Ken Ichi Fujita, et al. 2014. "Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* 14 (4). Elsevier Inc.: 535–48. doi:10.1016/j.stem.2014.01.011.
- Nangalia, J., C.E. Massie, E.J. Baxter, F.L. Nice, G. Gundem, D.C. Wedge, E. Avezov, et al. 2013. "Somatic *CALR* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated *JAK2*." *New England Journal of Medicine* 369 (25): 2391–2405. doi:10.1056/NEJMoa1312542.
- Nault, Jean Charles, Maxime Mallet, Camilla Pilati, Julien Calderaro, Paulette Bioulac-Sage, Christophe Laurent, Alexis Laurent, Daniel Cherqui, Charles Balabaud, and Jessica Zucman Rossi. 2013. "High Frequency of Telomerase Reverse-Transcriptase Promoter Somatic Mutations in Hepatocellular Carcinoma and Preneoplastic Lesions." *Nature Communications* 4 (May). Nature Publishing Group: 1–6. doi:10.1038/ncomms3218.
- Nikoloski, Gorica, Saskia M C Langemeijer, Roland P Kuiper, Ruth Knops, Marion Massop, Evelyn R L T M Tönnissen, Adrian van der Heijden, et al. 2010. "Somatic Mutations of the Histone Methyltransferase Gene *EZH2* in Myelodysplastic Syndromes." *Nature Genetics* 42 (8). Nature Publishing Group: 665–67. doi:10.1038/ng.620.
- Nilsson, Alexandra Rundberg, Shamit Soneji, Sofia Adolfsson, David Bryder, and Cornelis Jan Pronk. 2016. "Human and Murine Hematopoietic Stem Cell Aging Is Associated with Functional Impairments and Intrinsic Megakaryocytic/erythroid Bias." *PLoS ONE* 11 (7): 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0158369.
- Nishizawa, Masatoshi, Kazuhisa Chonabayashi, Masaki Nomura, Azusa Tanaka, Masahiro Nakamura, Azusa Inagaki, Misato Nishikawa, et al. 2016. "Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity." *Cell Stem Cell* 19 (3). Elsevier Inc.: 341–54. doi:10.1016/j.stem.2016.06.019.
- Niu, Xiaohua, Wenyan He, Bing Song, Zhanhui Ou, Di Fan, Yuchang Chen, Yong Fan, and Xiaofang Sun. 2016. "Combining Single Strand Oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to Correct Gene Mutations in β -Thalassemia-Induced Pluripotent Stem Cells." *Journal of Biological Chemistry* 291 (32): 16576–85. doi:10.1074/jbc.M116.719237.
- Noh, Ji Yoon, Shilpa Gandre-Babbe, Yuhuan Wang, Vincent Hayes, Yu Yao, Paul Gadue, Spencer K. Sullivan, et al. 2015. "Inducible Gata1 Suppression Expands Megakaryocyteerythroid Progenitors from Embryonic Stem Cells." *Journal of Clinical Investigation* 125 (6): 2369–74. doi:10.1172/JCI77670.
- Notta, F., S. Zandi, N. Takayama, S. Dobson, O. I. Gan, G. Wilson, K. B. Kaufmann, et al. 2016. "Distinct Routes of Lineage Development Reshape the Human Blood Hierarchy across Ontogeny." *Science* 351 (6269): aab2116–aab2116. doi:10.1126/science.aab2116.
- Nowell, Peter C. 1976. "The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations." *Science, New Series* 194 (4260): 23–28. doi:10.1098/rstb.2004.1522.
- Oakes, Christopher C., Rainer Claus, Lei Gu, Yassen Assenov, Jennifer Hüllein, Manuela Zucknick, Matthias Bieg, et al. 2014. "Evolution of DNA Methylation Is Linked to Genetic Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Cancer Discovery* 4 (3): 348–61. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0349.
- Olivier, Emmanuel N., Lamin Marenah, Angela McCahill, Alison Condie, Scott Cowan, and Joanne C. Mountford. 2016. "High-Efficiency Serum-Free Feeder-Free Erythroid Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Using Small Molecules." *STEM CELLS Translational Medicine* 5 (10): 1394–1405. doi:10.5966/sctm.2015-0371.
- Onida, F., and M Beran. 2004. "Chronic Myelomonocytic Leukemia: Myeloproliferative Variant." *Curr Hematol Rep* 3 (3): 218–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087071>.
- Orkin, Stuart H., and Leonard I. Zon. 2008. "Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology." *Cell* 132 (4): 631–44. doi:10.1016/j.cell.2008.01.025.



- Ortmann, Christina A., David G. Kent, Jyoti Nangalia, Yvonne Silber, David C. Wedge, Jacob Grinfeld, E. Joanna Baxter, et al. 2015. "Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms." *New England Journal of Medicine* 372 (7): 601–12. doi:10.1056/NEJMoa1412098.
- Padron, Eric, Jeffrey S. Painter, Sateesh Kunigal, Adam W. Mailloux, Kathy McGraw, Jessica M. McDaniel, Eunhee Kim, et al. 2013. "GM-CSF-Dependent pSTAT5 Sensitivity Is a Feature with Therapeutic Potential in Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Blood* 121 (25): 5068–77. doi:10.1182/blood-2012-10-460170.
- Pan, Heng, Yanwen Jiang, Michela Boi, Fabrizio Tabbò, David Redmond, Kui Nie, Marco Ladetto, et al. 2015. "Epigenomic Evolution in Diffuse Large B-Cell Lymphomas." *Nature Communications* 6: 6921. doi:10.1038/ncomms7921.
- Pan, Qun, Ofer Shai, Leo J Lee, Brendan J Frey, and Benjamin J Blencowe. 2008. "Deep Surveying of Alternative Splicing Complexity in the Human Transcriptome by High-Throughput Sequencing." *Nature Genetics* 40 (12): 1413–15. doi:10.1038/ng.259.
- Pandit, Shatakshi, Yu Zhou, Lily Shiue, Gabriela Coutinho-Mansfield, Hairi Li, Jinsong Qiu, Jie Huang, Gene W. Yeo, Manuel Ares, and Xiang Dong Fu. 2013. "Genome-Wide Analysis Reveals SR Protein Cooperation and Competition in Regulated Splicing." *Molecular Cell* 50 (2). Elsevier Inc.: 223–35. doi:10.1016/j.molcel.2013.03.001.
- Pang, Wendy W, Elizabeth a Price, Debashis Sahoo, Isabel Beerman, William J Maloney, Derrick J Rossi, Stanley L Schrier, and Irving L Weissman. 2011. "Human Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells Are Increased in Frequency and Myeloid-Biased with Age." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (50): 20012–17. doi:10.1073/pnas.1116110108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1116110108.
- Papaemmanuil, E., M. Cazzola, J. Boulwood, L. Malcovati, P. Vyas, D. Bowen, A. Pellagatti, et al. 2011. "Somatic *SF3B1* Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts." *New England Journal of Medicine* 365 (15): 1384–95. doi:10.1056/NEJMoa1103283.
- Papaemmanuil, Elli, Moritz Gerstung, Luca Malcovati, Sudhir Tauro, Gunes Gundem, Peter Van Loo, Chris J Yoon, et al. 2013. "Clinical and Biological Implications of Driver Mutations in Myelodysplastic Syndromes." *Blood* 122 (22): 3616–27. doi:10.1182/blood-2013-08-518886.The.
- Parikh, Chaitali, Ramesh Subrahmanyam, and Ruibao Ren. 2007. "Oncogenic NRAS, KRAS, and HRAS Exhibit Different Leukemogenic Potentials in Mice." *Cancer Research* 67 (15): 7139–46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0778.
- Park, Sophie, Myriam Labopin, Ibrahim Yakoub-Agha, Jacques Delaunay, Nathalie Dhedin, Eric Deconinck, Mauricette Michallet, et al. 2013. "Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Myelomonocytic Leukemia: A Report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire." *European Journal of Haematology* 90 (5): 355–64. doi:10.1111/ejh.12073.
- Park, Sung Mi, Jianhong Ou, Lynn Chamberlain, Tessa M. Simone, Huan Yang, Ching Man Virbasius, Abdullah M. Ali, et al. 2016. "U2AF35(S34F) Promotes Transformation by Directing Aberrant ATG7 Pre-mRNA 3' End Formation." *Molecular Cell* 62 (4). Elsevier Inc.: 479–90. doi:10.1016/j.molcel.2016.04.011.
- Park, Yongseok, Maria E. Figueroa, Laura S. Rozek, and Maureen A. Sartor. 2014. "MethylSig: A Whole Genome DNA Methylation Analysis Pipeline." *Bioinformatics* 30 (17): 2414–22. doi:10.1093/bioinformatics/btu339.
- Patel, Jay P., Ph.D. Mithat Gönen, M.D. Maria E. Figueroa, M.D. Hugo Fernandez, Ph.D. Zhuoxin Sun, Ph.D. Janis Racevskis, Ph.D. Pieter Van Vlierberghe, et al. 2012. "New England Journal." *N Engl J Med* 366 (20): 1859–69. doi:10.1056/NEJMoa1208410.
- Patnaik, Mrinal M., Terra L. Lasho, Christy M. Finke, Curtis A. Hanson, Rebecca L. King, Rhett P. Ketterling, Naseema Gangat, and Ayalew Tefferi. 2016. "Predictors of Survival in Refractory Anemia with Ring Sideroblasts and Thrombocytosis (RARS-T) and the Role of next-Generation Sequencing." *American Journal of Hematology* 91 (5): 492–98. doi:10.1002/ajh.24332.
- Patricelli, Matthew P., Matthew R. Janes, Lian Sheng Li, Rasmus Hansen, Ulf Peters, Linda V. Kessler, Yuching Chen, et al. 2016. "Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State." *Cancer Discovery* 6 (3): 316–29. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1105.
- Pereira, Carlos Filipe, Betty Chang, Jiajing Qiu, Xiaohong Niu, Dmitri Papatsenko, Caroline E. Hendry, Neil R. Clark, et al. 2013. "Induction of a Hemogenic Program in Mouse Fibroblasts." *Cell Stem Cell* 13 (2). Elsevier Inc.: 205–18. doi:10.1016/j.stem.2013.05.024.
- Perié, Leïla, Philip D. Hodgkin, Shalin H. Naik, Ton N. Schumacher, Rob J. deBoer, and Ken R. Duffy. 2014. "Determining Lineage Pathways from Cellular Barcoding Experiments." *Cell Reports* 6 (4): 617–24. doi:10.1016/j.celrep.2014.01.016.
- Pezeshkian, Bahareh, Christopher Donnelly, Kelley Tamburo, Timothy Geddes, and Gerard J. Madlambayan. 2013. "Leukemia Mediated Endothelial Cell Activation Modulates Leukemia Cell Susceptibility to Chemotherapy through a Positive Feedback Loop Mechanism." *PLoS ONE* 8 (4): 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0060823.
- Piazza, Rocco, Simona Valletta, Nils Winkelmann, Sara Redaelli, Roberta Spinelli, Alessandra Pirola, Laura Antolini, et al. 2012. "Recurrent SETBP1 Mutations in Atypical Chronic Myeloid Leukemia." *Nature Genetics* 45 (1). Nature Publishing Group: 18–24. doi:10.1038/ng.2495.
- Pick, Marjorie, Lisa Azzola, Anna Mossman, Edouard G. Stanley, and Andrew G. Elefanty. 2007. "Differentiation of Human Embryonic Stem Cells in Serum-Free Medium Reveals Distinct Roles for Bone Morphogenetic Protein 4, Vascular Endothelial Growth Factor, Stem Cell Factor, and Fibroblast Growth Factor 2 in Hematopoiesis." *Stem Cells* 25 (9): 2206–14. doi:10.1634/stemcells.2006-0713.
- Pronier, Elodie, Carole Almire, Hayat Mokrani, Aparna Vasanthakumar, Audrey Simon, Barbara Da Costa Reis Monte Mor, Aline Massé, et al. 2011. "Inhibition of TET2-Mediated Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine Disturbs Erythroid and Granulomonocytic Differentiation of Human Hematopoietic Progenitors." *Blood* 118 (9): 2551–55. doi:10.1182/blood-2010-12-324707.
- Puck, J M, C C Stewart, and R L Nussbaum. 1992. "Maximum-Likelihood Analysis of Human T-Cell X Chromosome Inactivation Patterns: Normal Women versus Carriers of X-Linked Severe Combined Immunodeficiency." *American Journal of Human Genetics* 50 (4): 742–48. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682632&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pulecio, Julian, Emmanuel Nivet, Ignacio Sancho-Martinez, Marianna Vitaloni, Guillermo Guenechea, Yun Xia, Leo Kurian, et al. 2014. "Conversion of Human Fibroblasts into Monocyte-like Progenitor Cells." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 32 (11): 2923–38. doi:10.1002/stem.1800.



- Quesada, Víctor, Laura Conde, Neus Villamor, Gonzalo R Ordóñez, Pedro Jares, Laia Bassaganyas, Andrew J Ramsay, et al. 2011. "Exome Sequencing Identifies Recurrent Mutations of the Splicing Factor SF3B1 Gene in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Nature Genetics* 44 (1). Nature Publishing Group: 47–52. doi:10.1038/ng.1032.
- Quivoron, Cyril, Lucile Couronné, Véronique Della Valle, Cécile K. Lopez, Isabelle Plo, Orianne Wagner-Ballon, Marcio Do Cruzeiro, et al. 2011. "TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis." *Cancer Cell* 20 (1): 25–38. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.003.
- Raaijmakers, Marc H. G. P., Siddhartha Mukherjee, Shangqin Guo, Siyi Zhang, Tatsuya Kobayashi, Jesse A. Schoonmaker, Benjamin L. Ebert, et al. 2010. "Bone Progenitor Dysfunction Induces Myelodysplasia and Secondary Leukaemia." *Nature* 464 (7290). Nature Publishing Group: 852–57. doi:10.1038/nature08851.
- Ramirez-Herrick, Ashley M., Shannon E. Mullican, Andrea M. Sheehan, and Orla M. Conneely. 2015. "Reduced NR4A Gene Dosage Leads to Mixed Myelodysplastic / Myeloproliferative Neoplasms in Mice Reduced NR4A Gene Dosage Leads to Mixed Myelodysplastic / Myeloproliferative Neoplasms in Mice." *Blood* 117 (9): 2681–91. doi:10.1182/blood-2010-02-267906.The.
- Rauen, Katherine A. 2013. "The RASopathies." *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* 14: 355–69. doi:10.1146/annurev-genom-091212-153523.
- Reardon, S., and D. Cyranoski. 2014. "Japan Stem-Cell Trial Stirs Envy." *Nature* 495 (7438): 13–14. doi:10.1038/509015a.
- Reynaud, Damien, Eric Pietras, Keegan Barry-Holson, Alain Mir, Mikhail Binnewies, Marion Jeanne, Olga Sala-Torra, Jerald P Radich, and Emmanuelle Passegué. 2011. "IL-6 Controls Leukemic Multipotent Progenitor Cell Fate and Contributes to Chronic Myelogenous Leukemia Development." *Cancer Cell* 20 (5): 661–73. doi:10.1016/j.ccr.2011.10.012.
- Rheinbay, Esther, Prasanna Parasuraman, Jonna Grimsby, Grace Tiao, Jesse M. Engreitz, Jaegil Kim, Michael S. Lawrence, et al. 2017. "Recurrent and Functional Regulatory Mutations in Breast Cancer." *Nature* 547 (7661). Nature Publishing Group: 55–60. doi:10.1038/nature22992.
- Ricci, Clara, Elisa Fermo, Stefania Corti, Mauro Molteni, Alessio Faricciotti, Agostino Cortelezzi, Giorgio Lambertenghi Delilieri, Miloslav Beran, and Francesco Onida. 2010. "RAS Mutations Contribute to Evolution of Chronic Myelomonocytic Leukemia to the Proliferative Variant." *Clinical Cancer Research* 16 (8): 2246–56. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2112.
- Rollison, Dana E, Nadia Howlader, Martyn T Smith, Sara S Strom, William D Merritt, Lynn A Ries, Brenda K Edwards, Alan F List, and Washington Dc. 2008. "Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myeloproliferative Disorders in the United States , 2001-2004 , Using Data from the NAACCR and SEER Programs Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myeloproliferative Disorders in the Un." *Program* 112 (1): 45–52. doi:10.1182/blood-2008-01-134858.
- Roman, Eve, Alex Smith, Simon Appleton, Simon Crouch, Richard Kelly, Sally Kinsey, Catherine Cargo, and Russell Patmore. 2016. "Myeloid Malignancies in the Real-World: Occurrence, Progression and Survival in the UK's Population-Based Haematological Malignancy Research Network 2004-15." *Cancer Epidemiology* 42. Elsevier Ltd: 186–98. doi:10.1016/j.canep.2016.03.011.
- Rongvaux, Anthony, Tim Willinger, Jan Martinek, Till Strowig, Sofia V Gearty, Lino L Teichmann, Yasuyuki Saito, et al. 2014. "Development and Function of Human Innate Immune Cells in a Humanized Mouse Model." *Nature Biotechnology* 32 (4). Nature Publishing Group: 364–72. doi:10.1038/nbt.2858.
- Roulois, David, Helen Loo Yau, Rajat Singhanian, Yadong Wang, Arnavav Danesh, Shu Yi Shen, Han Han, et al. 2015. "DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts." *Cell* 162 (5). Elsevier Inc.: 961–73. doi:10.1016/j.cell.2015.07.056.
- Rozenblatt-Rosen, Orit, Rahul C. Deo, Megha Padi, Guillaume Adelmant, Michael A. Calderwood, Thomas Rolland, Miranda Grace, et al. 2012. "Interpreting Cancer Genomes Using Systematic Host Network Perturbations by Tumour Virus Proteins." *Nature* 487 (7408): 491–95. doi:10.1038/nature11288.
- Rupec, Rudolf A., Franziska Jundt, Bernd Rebholz, Birgit Eckelt, Günther Weindl, Thomas Herzinger, Michael J. Flaig, et al. 2005. "Stroma-Mediated Dysregulation of Myelopoiesis in Mice Lacking IκBα." *Immunity* 22 (4): 479–91. doi:10.1016/j.immuni.2005.02.009.
- Sabnis, Amit J., Laurene S. Cheung, Monique Dail, Hio Chung Kang, Marianne Santaguida, Michelle L. Hermiston, Emmanuelle Passegué??, Kevin Shannon, and Benjamin S. Braun. 2009. "Oncogenic Kras Initiates Leukemia in Hematopoietic Stem Cells." *PLoS Biology* 7 (3). doi:10.1371/journal.pbio.1000059.
- Sacchetti, Benedetto, Alessia Funari, Stefano Michienzi, Silvia Di Cesare, Stefania Piersanti, Isabella Saggio, Enrico Tagliafico, et al. 2007. "Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment." *Cell* 131 (2): 324–36. doi:10.1016/j.cell.2007.08.025.
- Saliba, Joseph, Sofiane Hamidi, Gaëlle Lenglet, Thierry Langlois, Jingkui Yin, Xénia Cabagnols, Lise Secardin, et al. 2013. "Heterozygous and Homozygous JAK2V617F States Modeled by Induced Pluripotent Stem Cells from Myeloproliferative Neoplasm Patients." *PLoS ONE* 8 (9): 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0074257.
- Sanada, Masashi, Takahiro Suzuki, Lee-Yung Shih, Makoto Otsu, Motohiro Kato, Satoshi Yamazaki, Azusa Tamura, et al. 2009. "Gain-of-Function of Mutated C-CBL Tumour Suppressor in Myeloid Neoplasms." *Nature* 460 (7257). Nature Publishing Group: 904–8. doi:10.1038/nature08240.
- Sandler, Vladislav M., Nathalie Lailler, and Eric E. Bouhassira. 2011. "Reprogramming of Embryonic Human Fibroblasts into Fetal Hematopoietic Progenitors by Fusion with Human Fetal Liver cd34+ Cells." *PLoS ONE* 6 (4): 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0018265.
- Sandler, Vladislav M., Raphael Lis, Ying Liu, Alon Kedem, Daylon James, Olivier Elemento, Jason M. Butler, Joseph M. Scandura, and Shahin Rafii. 2014. "Reprogramming Human Endothelial Cells to Haematopoietic Cells Requires Vascular Induction." *Nature* 511 (7509): 312–18. doi:10.1038/nature13547.
- Sant, Milena, Claudia Allemani, Carmen Tereanu, Roberta De Angelis, Riccardo Capocaccia, Otto Visser, Rafael Marcos-Gragera, et al. 2010. "Incidence of Hematological Malignancies in Europe by Morphological Subtype: Results of the HAEMACARE Project." *Blood* 116 (19): blood-2010-05-282632. doi:10.1182/blood-2010-05-282632.
- Sato, Kazuya, Katsutoshi Ozaki, Iekuni Oh, Akiko Meguro, Keiko Hatanaka, Tadashi Nagai, Kazuo Muroi, and Keiyo Ozawa. 2015. "Nitric Oxide Plays a Critical Role in Suppression of T-Cell Proliferation by Mesenchymal Stem Cells." *Immunobiology* 109 (1):



228–35. doi:10.1182/blood-2006-02-002246.The.

- Schaal, T D, and T Maniatis. 1999. "Multiple Distinct Splicing Enhancers in the Protein-Coding Sequences of a Constitutively Spliced Pre-mRNA." *Molecular and Cellular Biology* 19 (1): 261–73. doi:0270-7306/99.
- Schanz, Julie, Heinz Tüchler, Francesc Solé, Mar Mallo, Elisa Luño, José Cervera, Isabel Granada, et al. 2012. "New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia after MDS Derived from an International Database Merge." *Journal of Clinical Oncology* 30 (8): 820–29. doi:10.1200/JCO.2011.35.6394.
- Scheffzek, Klaus, Mohammad Reza Ahmadian, Wolfgang Kabsch, Lisa Wiesmuller, Alfred Lautwein, Frank Schmitz, Alfred Wittinghofer, and The. 1997. "The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants." *Science* 277 (5324): 333–38. doi:10.1126/science.277.5324.333.
- Schepers, Koen, Eric M. Pietras, Damien Reynaud, Johanna Flach, Mikhail Binnewies, Trit Garg, Amy J. Wagers, Edward C. Hsiao, and Emmanuelle Passegué. 2013. "Myeloproliferative Neoplasia Remodels the Endosteal Bone Marrow Niche into a Self-Reinforcing Leukemic Niche." *Cell Stem Cell* 13 (3): 285–99. doi:10.1016/j.stem.2013.06.009.
- Schuler, E., M. Schroeder, J. Neukirchen, C. Strupp, B. Xicoy, A. Kündgen, B. Hildebrandt, R. Haas, N. Gattermann, and U. Germing. 2014. "Refined Medullary Blast and White Blood Cell Count Based Classification of Chronic Myelomonocytic Leukemias." *Leukemia Research* 38 (12). Elsevier Ltd: 1413–19. doi:10.1016/j.leukres.2014.09.003.
- Selimoglu-Buet, Dorothée, Bouchra Badaoui, Emmanuel Benayoun, Andrea Toma, Pierre Fenaux, Bruno Quesnel, Gabriel Etienne, et al. 2017. "Accumulation of Classical Monocytes Defines a Subgroup of MDS That Frequently Evolves into CMML." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (4): 1403–1404.e1. doi:10.1016/j.jaci.2016.09.062.
- Selimoglu-Buet, Dorothée, Oriane Wagner-Ballon, Véronique Saada, Valérie Bardet, Raphaël Itzykson, Laura Bencheikh, Margot Morabito, et al. 2015. "Characteristic Repartition of Monocyte Subsets as a Diagnostic Signature of Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Blood* 125 (23): 3618–26. doi:10.1182/blood-2015-01-620781.
- Senent, Leonor, Leonor Arenillas, Elisa Luño, Juan C. Ruiz, Guillermo Sanz, and Lourdes Florensa. 2013. "Reproducibility of the World Health Organization 2008 Criteria for Myelodysplastic Syndromes." *Haematologica* 98 (4): 568–75. doi:10.3324/haematol.2012.071449.
- Serrano, Manuel, Athena W. Lin, Mila E. McCurrach, David Beach, and Scott W. Lowe. 1997. "Oncogenic Ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16(INK4a)." *Cell* 88 (5): 593–602. doi:10.1016/S0092-8674(00)81902-9.
- Shaknovich, Rita, Subhajyoti De, and Franziska Michor. 2014. "Epigenetic Diversity in Hematopoietic Neoplasms." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1846 (2). Elsevier B.V.: 477–84. doi:10.1016/j.bbcan.2014.09.003.
- Shen, Sylvie W, Alla Dolnikov, Toby Passioura, Michelle Millington, Simon Wotherspoon, Alison Rice, Karen L Mackenzie, and Geoff Symonds. 2004. "2004 Mutant N-Ras Preferentially Drives Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells into Myeloid Differentiation and Proliferation Both in Vitro and in the NODSCID." *Experimental Hematology* 32: 852–60.
- Shlush, Liran I., Sasan Zandi, Amanda Mitchell, Weihsu Claire Chen, Joseph M. Brandwein, Vikas Gupta, James A. Kennedy, et al. 2014. "Identification of Pre-Leukaemic Haematopoietic Stem Cells in Acute Leukaemia." *Nature* 506 (7488). Nature Publishing Group: 328–33. doi:10.1038/nature13038.
- Simanshu, Dharendra K., Dwight V. Nissley, and Frank McCormick. 2017. "RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease." *Cell* 170 (1). Elsevier: 17–33. doi:10.1016/j.cell.2017.06.009.
- Singh, Ravinder, and Juan Valcárcel. 2005. "Building Specificity with Nonspecific RNA-Binding Proteins." *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (8): 645–53. doi:10.1038/nsmb961.
- Sipkins, Dorothy A., Xunbin Wei, Juweli W. Wu, Judith M. Runnels, Daniel Côté, Terry K. Means, Andrew D. Luster, David T. Scadden, and Charles P. Lin. 2005. "In Vivo Imaging of Specialized Bone Marrow Endothelial Microdomains for Tumour Engraftment." *Nature* 435 (7044): 969–73. doi:10.1038/nature03703.
- Slukvin, Igor I. 2013. "Review Article Hematopoietic Specification from Human Pluripotent Stem Cells : Current Advances and Challenges toward de Novo Generation of Hematopoietic Stem Cells." *Blood* 122 (25): 4035–46. doi:10.1182/blood-2013-07-474825.patients.
- Smith, Alexander E., Azim M. Mohamedali, Austin Kulasekararaj, Zi Yi Lim, Joop Gäken, Nicholas C. Lea, Bartłomiej Przychodzen, et al. 2010. "Next-Generation Sequencing of the TET2 Gene in 355 MDS and CMMLpatients Reveals Low-Abundance Mutant Clones with Early Origins, but Indicates No Definite Prognostic Value." *Blood* 116 (19): 3923–32. doi:10.1182/blood-2010-03-274704.
- Solary, Eric, and Raphael Itzykson. 2017. "How I Treat How I Treat Chronic Myelomonocytic Leukemia." *Blood* 130 (2): 126–37. doi:10.1182/blood-2017-04-736421.criteria.
- Sottoriva, A., I. Spiteri, S. G. M. Piccirillo, A. Touloumis, V. P. Collins, J. C. Marioni, C. Curtis, C. Watts, and S. Tavare. 2013. "Intratumor Heterogeneity in Human Glioblastoma Reflects Cancer Evolutionary Dynamics." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (10): 4009–14. doi:10.1073/pnas.1219747110.
- Sottoriva, Andrea, Haeyoun Kang, Zhicheng Ma, Trevor A Graham, Matthew P Salomon, Junsong Zhao, Paul Marjoram, et al. 2015. "A Big Bang Model of Human Colorectal Tumor Growth." *Nature Genetics* 47 (3). Nature Publishing Group: 209–16. doi:10.1038/ng.3214.
- Sottoriva, Andrea, Louis Vermeulen, and Simon Tavaré. 2011. "Modeling Evolutionary Dynamics of Epigenetic Mutations in Hierarchically Organized Tumors." *PLoS Computational Biology* 7 (5). doi:10.1371/journal.pcbi.1001132.
- Sperling, Adam S., Christopher J. Gibson, and Benjamin L. Ebert. 2016. "The Genetics of Myelodysplastic Syndrome: From Clonal Haematopoiesis to Secondary Leukaemia." *Nature Reviews Cancer* advance on (1). Nature Publishing Group: 5–19. doi:10.1038/nrc.2016.112.
- Spivak, Jerry L., Michael Considine, Donna M. Williams, Conover C. Talbot, Ophelia Rogers, Alison R. Moliterno, Chunfa Jie, and Michael F. Ochs. 2014. "Two Clinical Phenotypes in Polycythemia Vera." *New England Journal of Medicine* 371 (9): 808–17. doi:10.1056/NEJMoa1403141.



- Srouf, Samer A., Susan S. Devesa, Lindsay M. Morton, David P. Check, Rochelle E. Curtis, Martha S. Linet, and Graça M. Soares. 2016. "Incidence and Patient Survival of Myeloproliferative Neoplasms and Myelodysplastic/myeloproliferative Neoplasms in the United States, 2001–12." *British Journal of Haematology* 174 (3): 382–96. doi:10.1111/bjh.14061.
- Stein, Brady L., Donna M. Williams, Ophelia Rogers, Mary Ann Isaacs, Jerry L. Spivak, and Alison R. Moliterno. 2011. "Disease Burden at the Progenitor Level Is a Feature of Primary Myelofibrosis: A Multivariable Analysis of 164 JAK2 V617F-Positive Myeloproliferative Neoplasm Patients." *Experimental Hematology* 39 (1). ISEH - Society for Hematology and Stem Cells: 95–101. doi:10.1016/j.exphem.2010.09.008.
- Stein, Brady L., Donna M Williams, Nae-yuh Wang, Ophelia Rogers, Mary Ann Isaacs, Naveen Pemmaraju, Jerry L Spivak, and Alison R Moliterno. 2010. "Sex Differences in the JAK2 V617F Allele Burden in Chronic Myeloproliferative Disorders." *Haematologica* 95 (7): 1090–97. doi:10.3324/haematol.2009.014407.
- Sternecker, Jared L., Peter Reinhardt, and Hans R. Schöler. 2014. "Investigating Human Disease Using Stem Cell Models." *Nature Reviews Genetics* 15 (9). Nature Publishing Group: 625–39. doi:10.1038/nrg3764.
- Stricker, Stefan H., Andrew Feber, Pär G. Engström, Helena Carén, Kathreena M. Kurian, Yasuhiro Takashima, Colin Watts, et al. 2013. "Widespread Resetting of DNA Methylation in Glioblastoma-Initiating Cells Suppresses Malignant Cellular Behavior in a Lineage-Dependent Manner." *Genes and Development* 27 (6): 654–69. doi:10.1101/gad.212662.112.
- Sturgeon, Christopher M, Andrea Ditadi, Geneve Awong, Marion Kennedy, and Gordon Keller. 2014. "Wnt Signaling Controls the Specification of Definitive and Primitive Hematopoiesis from Human Pluripotent Stem Cells." *Nature Biotechnology* 32 (6). Nature Publishing Group: 554–61. doi:10.1038/nbt.2915.
- Sugimoto, N., and K. Eto. 2017. "Platelet Production from Induced Pluripotent Stem Cells." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 15 (9): 1717–27. doi:10.1111/jth.13736.
- Sugimura, Ryohichi, Deepak Kumar Jha, Areum Han, Clara Soria-Valles, Edroaldo Lummertz da Rocha, Yi-Fen Lu, Jeremy A. Goettel, et al. 2017. "Haematopoietic Stem and Progenitor Cells from Human Pluripotent Stem Cells." *Nature* 545 (7655). Nature Publishing Group: 432–38. doi:10.1038/nature22370.
- Suzuki, Nao, Satoshi Yamazaki, Tomoyuki Yamaguchi, Motohito Okabe, Hideki Masaki, Satoshi Takaki, Makoto Otsu, and Hiromitsu Nakauchi. 2013. "Generation of Engraftable Hematopoietic Stem Cells From Induced Pluripotent Stem Cells by Way of Teratoma Formation." *Molecular Therapy* 21 (7). The American Society of Gene & Cell Therapy: 1424–31. doi:10.1038/mt.2013.71.
- Swanton, Charles. 2015. "Cancer Evolution Constrained by Mutation Order," 2015–17.
- Symeonidis, Argiris, Anja van Biezen, Liesbeth de Wreede, Alfonso Piciocchi, Juergen Finke, Dietrich Beelen, Martin Bornhäuser, et al. 2015. "Achievement of Complete Remission Predicts Outcome of Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Chronic Myelomonocytic Leukaemia. A Study of the Chronic Malignancies Working Party of the European Group for Blood and Marrow Trans." *British Journal of Haematology* 171 (2): 239–46. doi:10.1111/bjh.13576.
- Szabo, Eva, Shrivanti Rampalli, Ruth M. Risueño, Angélique Schnerch, Ryan Mitchell, Aline Fiebig-Comyn, Marilyn Levadoux-Martin, and Mickie Bhatia. 2010. "Direct Conversion of Human Fibroblasts to Multilineage Blood Progenitors." *Nature* 468 (7323): 521–26. doi:10.1038/nature09591.
- Szulwach, Keith E., Xuekun Li, Yujing Li, Chun Xiao Song, Ji Woong Han, Sang Sung Kim, Sandeep Namburi, et al. 2011. "Integrating 5-Hydroxymethylcytosine into the Epigenomic Landscape of Human Embryonic Stem Cells." *PLoS Genetics* 7 (6). doi:10.1371/journal.pgen.1002154.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126 (4): 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tang, Y, I Horikawa, M Ajiro, A I Robles, K Fujita, A M Mondal, J K Stauffer, Z-M Zheng, and C C Harris. 2013. "Downregulation of Splicing Factor SRSF3 Induces p53 β , an Alternatively Spliced Isoform of p53 That Promotes Cellular Senescence." *Oncogene* 32 (22). Nature Publishing Group: 2792–98. doi:10.1038/onc.2012.288.
- Tennant, G. B., V. Walsh, L. N. Truran, P. Edwards, K. I. Mills, and A. K. Burnett. 2000. "Abnormalities of Adherent Layers Grown from Bone Marrow of Patients with Myelodysplasia." *British Journal of Haematology* 111 (3): 853–62. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02467.x.
- Teofili, Luciana, Maurizio Martini, Eugenia Rosa Nuzzolo, Sara Capodimonti, Maria Grazia Iachininoto, Alessandra Cocomazzi, Emiliano Fabiani, Maria Teresa Voso, and Luigi M. Larocca. 2015. "Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Myelodysplastic Syndromes: Possible Contribution of a Defective Vascular Niche to Myelodysplasia." *Neoplasia* 17 (5). The Authors.: 401–9. doi:10.1016/j.neo.2015.04.001.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. 2013. "Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia." *N Engl J Med* 368 (22): 2059–74. doi:10.1056/NEJMoa1301689.Genomic.
- Thomson, J A, J Kalishman, T G Golos, M Durning, C P Harris, R A Becker, and J P Hearn. 1995. "Isolation of a Primate Embryonic Stem Cell Line." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (17): 7844–48. doi:PMC41242.
- Thomson, James A, Joseph Itskovitz-eldor, Sander S Shapiro, Michelle A Waknitz, Jennifer J Swiergiel, Vivienne S Marshall, and Jeffrey M Jones. 1998. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science* 282 (5391): 1145–47. doi:10.1126/science.282.5391.1145.
- Till, JE, and EA McCulloch. 1980. "Hemopoietic Stem Cell Differentiation." *Biochimica et Biophysica Acta*, 431–59.
- Tobiasson, Magnus, Hani Abdulkadir, Andreas Lennartsson, Shintaro Katayama, Francesco Marabita, Ayla De Paepe, Mohsen Karimi, et al. 2017. "Comprehensive Mapping of the Effects of Azacitidine on DNA Methylation, Repressive/permissive Histone Marks and Gene Expression in Primary Cells from Patients with MDS and MDS-Related Disease." *Oncotarget* 8 (17): 28812–25. doi:10.18632/oncotarget.15807.
- Tsai, Hsing Chen, Huili Li, Leander Van Neste, Yi Cai, Carine Robert, Feyruz V. Rassool, James J. Shin, et al. 2012. "Transient Low Doses of DNA-Demethylating Agents Exert Durable Antitumor Effects on Hematological and Epithelial Tumor Cells." *Cancer Cell* 21 (3). Elsevier Inc.: 430–46. doi:10.1016/j.ccr.2011.12.029.



- Turunen, Janne J., Elina H. Niemelä, Bhupendra Verma, and Mikko J. Frilander. 2013. "The Significant Other: Splicing by the Minor Spliceosome." *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4 (1): 61–76. doi:10.1002/wrna.1141.
- Ule, Jernej, Giovanni Stefani, Aldo Mele, Matteo Ruggiu, Xuning Wang, Bahar Taneri, Terry Gaasterland, Benjamin J. Blencowe, and Robert B. Darnell. 2006. "An RNA Map Predicting Nova-Dependent Splicing Regulation." *Nature* 444 (7119): 580–86. doi:10.1038/nature05304.
- Unnikrishnan, Ashwin, Elli Papaemmanuil, Dominik Beck, Nandan P. Deshpande, Arjun Verma, Ashu Kumari, Petter S. Woll, et al. 2017. "Integrative Genomics Identifies the Molecular Basis of Resistance to Azacitidine Therapy in Myelodysplastic Syndromes." *Cell Reports* 20 (3). Elsevier Company.: 572–85. doi:10.1016/j.celrep.2017.06.067.
- Utikal, J., N. Maherali, W. Kulalert, and K. Hochedlinger. 2009. "Sox2 Is Dispensable for the Reprogramming of Melanocytes and Melanoma Cells into Induced Pluripotent Stem Cells." *Journal of Cell Science* 122 (19): 3502–10. doi:10.1242/jcs.054783.
- Vainchenker, W, and S N Constantinescu. 2013. "JAK/STAT Signaling in Hematological Malignancies." *Oncogene* 32 (21). Nature Publishing Group: 2601–13. doi:10.1038/onc.2012.347.
- Vainchenker, William, Stefan N Constantinescu, Olivier A Bernard, and Institut Gustave Roussy. 2011. "New Mutations and Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms." *October* 118 (7): 1–3. doi:10.1182/blood-2011-02-292102.
- Vardiman, James W, Nancy Lee Harris, and Richard D Brunning. 2002. "Review Article The World Health Organization (WHO) Classification of the Myeloid Neoplasms." *October* 100 (7): 2292–2302. doi:10.1182/blood-2002-04-1199.Reprints.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber Da Et Al. 2008. "The 2008 Revision of the WHO Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Rationale and Important Changes." *Blood* 114 (5): 937–52. doi:10.1182/blood-2009-03-209262.
- Velten, Lars, Simon F. Haas, Simon Raffel, Sandra Blaszkiewicz, Saiful Islam, Bianca P. Hennig, Christoph Hirche, et al. 2017. "Human Haematopoietic Stem Cell Lineage Commitment Is a Continuous Process." *Nature Cell Biology* 19 (4): 271–81. doi:10.1038/ncb3493.
- Vickers, Mark A. 2007. "JAK2 617V>F-Positive Polycythemia Rubra Vera Maintained by Approximately 18 Stochastic Stem-Cell Divisions per Year, Explaining Age of Onset by a Single Rate-Limiting Mutation." *Blood* 110 (5): 1675–80. doi:10.1182/blood-2006-12-061911.
- Vitaloni, Marianna, Julian Pulecio, Josipa Bilic, Bernd Kuebler, Leopoldo Laricchia-Robbio, and Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2014. "MicroRNAs Contribute to Induced Pluripotent Stem Cell Somatic Donor Memory." *Journal of Biological Chemistry* 289 (4): 2084–98. doi:10.1074/jbc.M113.538702.
- Vogelstein, Bert, Eric R Fearon, Stanley R Hamilton, Ann C Preisinger, Huntington F Vvillard, Alan M Michelson, Arthur D Riggs, and Stuart H Orkin. 1987. "Clonal Analysis Using Recombinant DNA Probes from the X-Chromosome1." *Cancer Research*, no. 28.
- Wahl, Markus C., Cindy L. Will, and Reinhard Lührmann. 2009. "The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine." *Cell* 136 (4): 701–18. doi:10.1016/j.cell.2009.02.009.
- Wahlster, Lara, and George Q. Daley. 2016. "Progress towards Generation of Human Haematopoietic Stem Cells." *Nature Cell Biology* 18 (11): 1111–17. doi:10.1038/ncb3419.
- Walkley, Carl R., Gemma Haines Olsen, Sebastian Dworkin, Stewart A. Fabb, Jeremy Swann, Grant A. A. McArthur, Susan V. Westmoreland, Pierre Chambon, David T. Scadden, and Louise E. Purton. 2007. "A Microenvironment-Induced Myeloproliferative Syndrome Caused by Retinoic Acid Receptor γ Deficiency." *Cell* 129 (6): 1097–1110. doi:10.1016/j.cell.2007.05.014.
- Walter, Matthew J., Dong Shen, Li Ding, Jin Shao, Daniel C. Koboldt, Ken Chen, David E. Larson, et al. 2012. "Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia." *New England Journal of Medicine* 366 (12): 1090–98. doi:10.1056/NEJMoa1106968.
- Wang, Eric T., Rickard Sandberg, Shujun Luo, Irina Khrebtkova, Lu Zhang, Christine Mayr, Stephen F. Kingsmore, Gary P. Schroth, and Christopher B. Burge. 2008. "Alternative Isoform Regulation in Human Tissue Transcriptomes." *Nature* 456 (7221): 470–76. doi:10.1038/nature07509.
- Wang, Jinyong, Yangang Liu, Zeyang Li, Zhongde Wang, Li Xuan Tan, Myung Jeom Ryu, Benjamin Meline, et al. 2011. "Endogenous Oncogenic Nras Mutation Initiates Hematopoietic Malignancies in a Dose- and Cell Type-Dependent Manner." *Blood* 118 (2): 368–79. doi:10.1182/blood-2010-12-326058.
- Wang, L, M S Lawrence, Y Wan, P Stojanov, C Sougnez, K Stevenson, L Werner, et al. 2011. "SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia." *N Engl J Med* 365 (26): 2497–2506. doi:10.1056/NEJMoa1109016.
- Wang, Ping, Jing Qu, Min-Zu Wu, Weizhou Zhang, Guang-Hui Liu, and Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2013. "'TET-On' Pluripotency." *Cell Research* 23 (7): 863–65. doi:10.1038/cr.2013.72.
- Wang, Sa A, Robert P Hasserjian, Patricia S Fox, Heesun J Rogers, Julia T Geyer, Devon Chabot-richards, Elizabeth Weinzierl, et al. 2015. "Atypical Chronic Myeloid Leukemia Is Clinically Distinct from Unclassifiable Myelodysplastic / Myeloproliferative Neoplasms." *Blood* 123 (17): 2645–52. doi:10.1182/blood-2014-02-553800.The.
- Wang, Zefeng, and Christopher B Burge. 2008. "Splicing Regulation : From a Parts List of Regulatory Elements to an Integrated Splicing Code Splicing Regulation : From a Parts List of Regulatory Elements to an Integrated Splicing Code." *Rna* 14 (617): 802–13. doi:10.1261/rna.876308.802.
- Wassie, Emnet, Christy Finke, Naseema Gangat, Terra L. Lasho, Animesh Pardanan, Curtis A. Hanson, Rhett P. Ketterling, and Ayalew Tefferi. 2015. "A Compendium of Cytogenetic Abnormalities in Myelofibrosis: Molecular and Phenotypic Correlates in 826 Patients." *British Journal of Haematology* 169 (1): 71–76. doi:10.1111/bjh.13260.
- Welch, John S., Timothy J. Ley, Daniel C. Link, Christopher A. Miller, David E. Larson, Daniel C. Koboldt, Lukas D. Wartman, et al. 2012. "The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia." *Cell* 150 (2): 264–78. doi:10.1016/j.cell.2012.06.023.
- Welner, Robert S., Giovanni Amabile, Deepak Bararia, Akos Czibere, Henry Yang, Hong Zhang, Lorena Lobo De Figueiredo Pontes, et al. 2015. "Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia by Blocking Cytokine Alterations Found in Normal Stem and Progenitor Cells." *Cancer Cell* 27 (5). Elsevier Inc.: 671–81. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.004.
- Williams, Kristine, Jesper Christensen, Marianne Terndrup Pedersen, Jens V. Johansen, Paul A. C. Cloos, Juri Rappsilber, and Kristian Helin. 2011. "TET1 and Hydroxymethylcytosine in Transcription and DNA Methylation Fidelity." *Nature* 473 (7347). Nature



Publishing Group: 343–48. doi:10.1038/nature10066.

- Wolff, Florian, Michael Leisch, Richard Greil, Angela Risch, and Lisa Pleyer. 2017. "The Double-Edged Sword of (Re)expression of Genes by Hypomethylating Agents: From Viral Mimicry to Exploitation as Priming Agents for Targeted Immune Checkpoint Modulation." *Cell Communication and Signaling* 15 (1). Cell Communication and Signaling: 13. doi:10.1186/s12964-017-0168-z.
- Wu, Hao, Ana C. D'Alessio, Shinsuke Ito, Kai Xia, Zhibin Wang, Kairong Cui, Keji Zhao, Yi Eve Sun, and Yi Zhang. 2011. "Dual Functions of Tet1 in Transcriptional Regulation in Mouse Embryonic Stem Cells." *Nature* 473 (7347). Nature Publishing Group: 389–93. doi:10.1038/nature09934.
- Wu, Mei Yi, Karen W. Eldin, and Arthur L. Beaudet. 2008. "Identification of Chromatin Remodeling Genes Arid4a and Arid4b as Leukemia Suppressor Genes." *Journal of the National Cancer Institute* 100 (17): 1247–59. doi:10.1093/jnci/djn253.
- Wu, Ming, José Carlos Pastor-Pareja, and Tian Xu. 2010. "Interaction between RasV12 and Scribbled Clones Induces Tumour Growth and Invasion." *Nature* 463 (7280): 545–48. doi:10.1038/nature08702.
- Xiao, Ran, Ye Sun, Jian-Hua Ding, Shengrong Lin, Dave W Rose, Michael G Rosenfeld, Xiang-Dong Fu, and Xue Li. 2007. "Splicing Regulator SC35 Is Essential for Genomic Stability and Cell Proliferation during Mammalian Organogenesis." *Molecular and Cellular Biology* 27 (15): 5393–5402. doi:10.1128/MCB.00288-07.
- Xie, Mingchao, Charles Lu, Jiayin Wang, Michael D McLellan, Kimberly J Johnson, Michael C Wendl, Joshua F McMichael, et al. 2014. "Age-Related Mutations Associated with Clonal Hematopoietic Expansion and Malignancies." *Nature Medicine* 20 (12). Nature Publishing Group: 1472–78. doi:10.1038/nm.3733.
- Xu, Jin, Christian Hedberg, Frank J Dekker, Qing Li, Kevin M Haigis, Eugene Hwang, Kevin Shannon, Washington Dc, and Herbert Waldmann. 2012. "Inhibiting the Palmitoylation / Depalmitoylation Cycle Selectively Reduces the Growth of Hematopoietic Cells Expressing Oncogenic Nras Brief Report Inhibiting the Palmitoylation / Depalmitoylation Cycle Selectively Reduces the Growth of Hematopoietic Cell." *Blood* 119 (4): 1032–35. doi:10.1182/blood-2011-06-358960.
- Xue, Yuanhao, Yu Zhou, Tongbin Wu, Tuo Zhu, Xiong Ji, Young Soo Kwon, Chao Zhang, et al. 2009. "Genome-Wide Analysis of PTB-RNA Interactions Reveals a Strategy Used by the General Splicing Repressor to Modulate Exon Inclusion or Skipping." *Molecular Cell* 36 (6). Elsevier Ltd: 996–1006. doi:10.1016/j.molcel.2009.12.003.
- Yamamoto, Ryo, Yohei Morita, Jun Ooehara, Sanae Hamanaka, Masafumi Onodera, Karl Lenhard Rudolph, Hideo Ema, and Hiromitsu Nakauchi. 2013. "Clonal Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells." *Cell* 154 (5). Elsevier Inc.: 1112–26. doi:10.1016/j.cell.2013.08.007.
- Yates, Lucy R, Moritz Gerstung, Stian Knappskog, Christine Desmedt, Gunes Gundem, Peter Van Loo, Turid Aas, et al. 2015. "Subclonal Diversification of Primary Breast Cancer Revealed by Multiregion Sequencing." *Nature Medicine* 21 (7): 751–59. doi:10.1038/nm.3886.
- Ye, Zhaohui, Cyndi F. Liu, Lucie Lanikova, Sarah N. Dowey, Chaoxia He, Xiaosong Huang, Robert A. Brodsky, Jerry L. Spivak, Josef T. Prchal, and Linzhao Cheng. 2014. "Differential Sensitivity to Jak Inhibitory Drugs by Isogenic Human Erythroblasts and Hematopoietic Progenitors Generated from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells." *Stem Cells* 32 (1): 269–78. doi:10.1002/stem.1545.
- Ye, Zhaohui, Huichun Zhan, Sarah Dowey, Donna M Williams, Yoon-young Jang, Chi V Dang, Jerry L Spivak, Alison R Moliterno, Linzhao Cheng, and Prashant Mali. 2009. "Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Blood Cells of Healthy Donors and Patients with Acquired Blood Disorders." *Blood Cells* 114 (27): 5473–80. doi:10.1182/blood-2009-04-217406.
- Yildirim, Eda, James E. Kirby, Diane E. Brown, Francois E. Mercier, Ruslan I. Sadreyev, David T. Scadden, and Jeannie T. Lee. 2013. "Xist RNA Is a Potent Suppressor of Hematologic Cancer in Mice." *Cell* 152 (4): 727–42. doi:10.1016/j.cell.2013.01.034.
- Yoder, Mervin C. 2014. "Inducing Definitive Hematopoiesis in a Dish." *Nature Biotechnology* 32 (6). Nature Publishing Group: 539–41. doi:10.1038/nbt.2929.
- Yoshida, Kenichi, Masashi Sanada, Yuichi Shiraishi, Daniel Nowak, Yasunobu Nagata, Ryo Yamamoto, Yusuke Sato, et al. 2011. "Frequent Pathway Mutations of Splicing Machinery in Myelodysplasia." *Nature* 478 (7367): 64–69. doi:10.1038/nature10496.
- Yu, Vionnie W.C., Rushdia Z. Yusuf, Toshihiko Oki, Juwell Wu, Borja Saez, Xin Wang, Colleen Cook, et al. 2017. "Epigenetic Memory Underlies Cell-Autonomous Heterogeneous Behavior of Hematopoietic Stem Cells." *Cell* 168 (5). Elsevier: 944–45. doi:10.1016/j.cell.2017.02.010.
- Zahler, A M, W S Lane, J A Stolk, and M B Roth. 1992. "SR Proteins - A Conserved Family of Pre-Messenger-RNA Splicing Factors." *Genes Dev* 6 (5): 837–47. doi:10.1101/gad.6.5.837.
- Zambetti, Noemi A., Zhen Ping, Si Chen, Keane J.G. Kenswil, Maria A. Mylona, Mathijs A. Sanders, Remco M. Hoogenboezem, et al. 2016. "Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-Leukemia." *Cell Stem Cell* 19 (5). Elsevier Inc.: 613–27. doi:10.1016/j.stem.2016.08.021.
- Zhang, Jian, Yen K Lieu, Abdullah M Ali, Alex Penson, Kathryn S Reggio, Raul Rabadan, Azra Raza, Siddhartha Mukherjee, and James L Manley. 2015. "Disease-Associated Mutation in SRSF2 Misregulates Splicing by Altering RNA-Binding Affinities." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (34): E4726–34. doi:10.1073/pnas.1514105112.
- Zhang, Jian, and James L. Manley. 2013. "Misregulation of Pre-mRNA Alternative Splicing in Cancer." *Cancer Discovery* 3 (11): 1228–37. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0253.
- Zhang, Jing, Merav Socolovsky, Alec W Gross, and Harvey F Lodish. 2003. "Role of Ras Signaling in Erythroid Differentiation of Mouse Fetal Liver Cells : Functional Analysis by a Flow Cytometry – Based Novel Culture System." *Differentiation* 102 (12): 3938–46. doi:10.1182/blood-2003-05-1479.Supported.
- Zhang, Q, K Zhao, Q Shen, Y Han, Y Gu, X Li, D Zhao, et al. 2015. "Tet2 Is Required to Resolve Inflammation by Recruiting Hdac2 to Specifically Repress IL-6." *Nature* 525 (7569): 389–93. doi:10.1038/nature15252.
- Zhang, X, F D Cruz, M Terry, F Remotti, and I Matushansky. 2013. "Terminal Differentiation and Loss of Tumorigenicity of Human Cancers via Pluripotency-Based Reprogramming." *Oncogene* 32 (18). Nature Publishing Group: 2249–60.



doi:10.1038/onc.2012.237.

- Zhao, Senming, Rebekka Wehner, Martin Bornhäuser, Ralf Wassmuth, Michael Bachmann, and Marc Schmitz. 2010. "Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells and Their Therapeutic Consequences for Immune-Mediated Disorders." *Stem Cells and Development* 19 (5): 607–14. doi:10.1089/scd.2009.0345.
- Zhou, Zhihong, and Xiang Dong Fu. 2013. "Regulation of Splicing by SR Proteins and SR Protein-Specific Kinases." *Chromosoma* 122 (3): 191–207. doi:10.1007/s00412-013-0407-z.
- Ziegler-Heitbrock, Loems, Petronela Ancuta, Suzanne Crowe, Marc Dalod, Veronika Grau, N Derek, Pieter J M Leenen, et al. 2014. "Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in Blood Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in Blood." *Blood* 116 (16): 5–7. doi:10.1182/blood-2010-02-258558.
- Zimmer, Stephanie N., Madeleine E. Lemieux, Bijal P. Karia, Claudia Day, Ting Zhou, Qing Zhou, Andrew L. Kung, et al. 2012. "Mice Heterozygous for CREB Binding Protein Are Hypersensitive to γ -Radiation and Invariably Develop Myelodysplastic/myeloproliferative Neoplasm." *Experimental Hematology* 40 (4). ISEH - Society for Hematology and Stem Cells: 295–306.e5. doi:10.1016/j.exphem.2011.12.004.
- Zinkel, Sandra S., Christy C. Ong, David O. Ferguson, Hiromi Iwasaki, Koichi Akashi, Roderick T. Bronson, Jeffery L. Kutok, Frederick W. Alt, and Stanley J. Korsmeyer. 2003. "Proapoptotic BID Is Required for Myeloid Homeostasis and Tumor Suppression." *Genes and Development* 17 (2): 229–39. doi:10.1101/gad.1045603.
- Zoi, Katerina, and Nicholas C.P. Cross. 2017. "Genomics of Myeloproliferative Neoplasms." *Journal of Clinical Oncology* 35 (9): 947–54. doi:10.1200/JCO.2016.70.7968.



Titre : Modélisation de la leucémie myélomonocytaire chronique par reprogrammation de cellules de patients.

Mots clés : SRSF2, cellules pluripotentes induites, leucémie, LMMC, modélisation

Résumé : La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une hémopathie myéloïde rare attribuée à l'accumulation d'évènements génétiques et épigénétiques dans une cellule souche ou progénitrice hématopoïétique. Les altérations génétiques somatiques récurrentes qui caractérisent cette maladie ont été identifiées : elles associent des altérations cytogénétiques non spécifiques chez 30% des patients et des mutations des gènes de la régulation épigénétique, de l'épissage, de la signalisation et de la transcription. Si certaines mutations influencent le phénotype (les mutations de *RUNX1* génèrent une thrombopénie, celles de la signalisation une maladie proliférative, celles de *KIT* une mastocytose), elles ne sauraient résumer à elles seules l'expression phénotypique de la maladie. D'ailleurs, les médicaments hypométhylants restaurent une hématopoïèse équilibrée en modifiant le contexte épigénétique des cellules malades sans les éliminer. Il n'existe pas de lignée cellulaire de LMMC et les modèles murins n'en récapitulent que très partiellement les caractéristiques. L'objectif de mon travail de thèse a été de générer des cellules modélisant la maladie.

J'ai transformé les cellules CD34⁺ de 2 patients en clones de cellules souches induites reprogrammées. Les clones obtenus à partir de l'un des patients ont été écartés du fait d'altérations génétiques supplémentaires acquises lors de la reprogrammation. Nous avons focalisé nos travaux sur 5 clones établis à partir des cellules CD34⁺ de l'autre patient et de 5 clones établis à partir de cellules CD34⁺ de deux sujets sains. Nous avons capturé 2 étapes de l'évolution moléculaire du clone, sans puis avec mutation *KRAS*^{V12G}. La différenciation hématopoïétique de ces clones en milieu semi-solide ou liquide récapitule les principales caractéristiques phénotypiques de la maladie. Par édition de gènes, nous avons ajouté dans certains clones la mutation *SRSF2*^{P95H} observée dans les cellules de 50% des patients atteints de LMMC mais absente des cellules de la patiente étudiée. Nous montrons que l'hétérogénéité fonctionnelle et épigénétique des clones obtenus dépasse la seule hétérogénéité génétique et que la decitabine, un agent hypométhylant, a un effet cytotoxique faible mais améliorer l'équilibre de la production des cellules hématopoïétiques matures par des cellules génétiquement altérées

Title : Modeling chronic myelomonocytic leukemia by reprogramming patients cells

Keywords : SRSF2, iPSC, CMML, leukemia, modeling

Abstract: Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a rare hematological malignancy that has been related to the accumulation of genetic and epigenetic alterations in a hematopoietic stem or progenitor cell. Somatic recurrent mutations of coding DNA sequences have been in CMML cells, combining non-specific cytogenetic aberrations in 30% of the patients and mutations in epigenetic regulator, signal transduction, spliceosome and transcription factor genes. While some of these mutations directly affect disease phenotype (mutations in *RUNX1* and thrombocytopeny, mutations in signaling pathways and proliferative disease, mutations in *KIT* and mastocytosis), they do not sum up the complex disease phenotype of this pathology on their own. Accordingly, hypomethylating agents restore a balanced hematopoiesis without eliminating clonal cells. There is no CMML cell line and murine models only partially recapitulate the disease. The objective of my thesis work was to reprogram hematopoietic stem/progenitor cells in order to model the disease heterogeneous expression.

The clones established from one patient cells were discarded as their genetic background had been altered by reprogramming and cell culture. We analyzed in more details the behavior of 5 induced pluripotent stem cell lines established from a second patient and 5 other clones established from 2 healthy donor cells. We had captured 2 distinct genetic backgrounds of the patient clone, without or with *KRAS*^{G12D} mutation. Hematopoietic differentiation of these clones in semi-solid and liquid medium recapitulated the main characteristics of disease phenotype. With a gene editing tool, we introduced in some clones the *SRSF2*^{P95H} mutation, observed in 50% of patient with CMML but missing in the studied patient. We noticed that functional and epigenetic heterogeneity of the clones exceeded their genetic heterogeneity and that the demethylating agent decitabine had limited cytotoxic effect but restored a more balanced production of hematopoietic cells by genetically abnormal cells.