



HAL
open science

Etude fonctionnelle des marqueurs pronostiques CD81 et ABCB1 dans les leucémies aiguës myéloïdes

Fanny Gonzales

► **To cite this version:**

Fanny Gonzales. Etude fonctionnelle des marqueurs pronostiques CD81 et ABCB1 dans les leucémies aiguës myéloïdes. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2020. Français. NNT : 2020LILUS001 . tel-02976073

HAL Id: tel-02976073

<https://theses.hal.science/tel-02976073>

Submitted on 23 Oct 2020

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.

UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

Discipline : Hématologie

Fanny Gonzales

ETUDE FONCTIONNELLE DES MARQUEURS PRONOSTIQUES CD81 ET
ABCB1 DANS LES LEUCEMIES AIGUES MYÉLOÏDES

Soutenue publiquement le 6 février 2020 devant le jury composé de :

Professeur Bruno QUESNEL
Professeur Virginie GANDEMER
Professeur Eric DELABESSE
Docteur Brigitte NELKEN
Professeur Arnaud PETIT
Docteur Meyling CHEOK

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Remerciements :

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury de cette thèse :

En premier lieu, Monsieur le Professeur Bruno Quesnel, qui me fait l'honneur de présider cette thèse.

Je vous remercie pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe, soutenue tout au long de mon travail de thèse et encouragée pour la soutenance. Votre implication scientifique et humaine au sein de l'équipe suscite mon profond respect.

Un très grand merci aux Professeurs Virginie Gandemer et Eric Delabesse qui ont accepté d'être jurys et rapporteurs de cette thèse, merci pour votre disponibilité et votre intérêt dans mon projet.

Merci au Professeur Arnaud Petit, qui a accepté avec entrain de participer à mon jury de thèse. Je suis très honorée de votre présence dans ce jury.

Je remercie également le Docteur Brigitte Nelken pour sa présence dans mon jury, mais surtout pour avoir accepté que je mène ce projet en parallèle de mon clinicat et pour son soutien au quotidien dans mon parcours professionnel.

Je remercie également les Professeurs Claude Preudhomme et Charles Dumontet, qui malheureusement, ne peuvent pas faire partie de ce jury mais qui ont suivi ce travail avec attention, merci pour vos conseils pertinents et votre soutien. Soyez assurés de ma sincère gratitude.

Je tiens à remercier le Docteur Meyling Cheok qui m'a encadrée pour ce projet. Merci pour la confiance que tu m'accordes, pour ton enthousiasme pour le projet en cours et les projets à venir et pour ta disponibilité.

Je remercie également le Docteur Thomas Boyer qui avait initié ce travail et François Sevrin qui, au cours de son Master 2, a repris une partie de ce travail.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien du Centre Hospitalier de Lille qui m'a permis, grâce à une bourse de recherche de me consacrer à l'élaboration de ma thèse pendant un an à temps complet.

Il est des personnes sans qui ce travail n'aurait jamais pu aboutir : Pauline Peyrouze qui m'a apporté une aide technique précieuse et un soutien moral perpétuel depuis mon premier jour au laboratoire, mes collègues du service d'hématologie pédiatrique et notamment les Docteurs Bénédicte Bruno et Wadih Abou Chahla qui m'ont libérée du temps pour mes travaux de recherche.

Au cours de ce projet, j'ai rencontré plusieurs personnes qui m'ont aidée et inspirée à leur façon; notamment le Docteur Soizic Guihard, ma tutrice de Master 2, qui m'a

appris à prendre des initiatives et à tirer parti de chaque expérience ; Elisabeth Bertrand et Hassiba Bouafia, mes guides au sein du laboratoire ; le Docteur Adeline Barthélémy qui m'a toujours aidée avec patience et gentillesse ; Nathalie Jouy pour son aide en cytométrie en flux et le Docteur Meriem Tardyvel et Antonino Bongiovanni pour leur aide en microscopie confocale.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années. Merci à mes parents, pour leur soutien et leur confiance indéfectible dans mes choix, à Romain pour sa présence bienveillante à mes côtés, son écoute attentive et ses conseils avisés; à Manou, Jeanne, Joëlle, Jean-Michel, Yvonne et Martine qui sont prêts pour la soutenance depuis mon inscription en thèse.

Enfin, merci à Clément, qui m'a donné le courage nécessaire pour entreprendre, poursuivre et achever ce projet.

ABSTRACT

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous disease. Currently, therapeutic stratification relies on cytogenetics and molecular markers. In the majority of cases, relapses, probably due to leukemic stem cells (LSC), are challenging to predict.

My thesis encompasses the clinical and functional study of two poor prognostic factors related to LSC:

1/ ABCB1, a member of the ATP binding cassette transporter family, known for its implication in drug resistance, although the mechanism remains unclear and

2/ CD81, a protein belonging to the tetraspanin family, for which we were the first to uncover its prognostic role in adult AML and for which the underlying mechanisms are presently unknown.

Methods

1/ For ABCB1, we evaluated its activity in relation to clinical parameters and treatment response to standard chemotherapy in 321 patients with AML. We assessed multiple clinical relationships of ABCB1 activity—*ex vivo* drug resistance, gene expression, and evaluated an ABCB1 inhibitor.

2/ For CD81, we established AML cell lines with varying degrees of CD81 expression, either by cDNA over-expression or by shRNA mediated knock-down. On these models, we tested chemotherapy resistance, cellular proliferation, adhesion, migration and invasion. We performed confocal microscopy to study morphologic cell features.

We injected NSG mice with different modified AML cells to study engraftment, homing and tumor invasion. We performed patient-derived-xenografts (PDX) to study the association between blasts CD81 expression and AML engraftment.

Results

1/ ABCB1 activity was observed in 58% of AML and was linked to low white blood cell count, high expression of CD34, absence of *FLT3-ITD* and absence of mutant *NPM1*. Moreover, ABCB1 activity was associated with worse overall- and event-free survival. However, ABCB1 activity did not directly lead to *ex vivo* drug resistance to anthracyclines. We found that *ABCB1* expression was highly correlated with gene expressions of *BAALC*, *CD34*, *CD200*, and *CD7*, indicating that *ABCB1* expression may be a passenger characteristic of high-risk AML. Furthermore, *ABCB1* expression was inversely correlated to *HOX* cluster genes and *CD33*.

2/ In PDX, engraftment rate was associated with higher CD81 expression and time-to engraftment was inversely correlated to the level of CD81 expression. The PDX with modified cell lines revealed increased tumor invasion in association with higher CD81 expression.

Furthermore, we showed that high CD81 expression induced *in vitro* 1) adhesion to fibronectin and fibroblasts cells, 2) migration towards fibroblasts and 3) tumor invasion into a semisolid gel matrix. Using confocal microscopy, we observed that high CD81 cells form lamellipods implicated in cellular motility. We also established an

association between CD81 expression and chemotherapy resistance, notably to daunorubicin.

Conclusions

1/ We showed prognostic importance of ABCB1 gene expression, protein expression, and activity. Furthermore, ABCB1 was not directly linked to drug resistance, as ABCB1 inhibition did not improve outcome of high ABCB1 AML patients. High ABCB1 may represent a passenger characteristic of high-risk AML. Finally, low ABCB1 AML patients could benefit specifically from anti-CD33 treatment by gemtuzumab ozogamicin in addition to standard chemotherapy.

2/ High CD81 expression is linked to dismal prognosis in AML patients and in our PDX model. CD81 expression on blasts at diagnosis promotes engraftment in NSG mice; which may thus be a marker of stemness. Currently, we are testing CD81 antibody as a potential treatment using a murine xenograft model. Higher CD81 leads to enhanced capacity of adhesion, migration and invasion mediated by the formation of lamellipods and we are now investigating the implication of the Rac-RhoGTPases signaling pathways as an underlying mechanism.

RESUME

Introduction

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une hémopathie hétérogène. La stratification thérapeutique repose sur les anomalies cytogénétiques et moléculaires. Les rechutes, probablement liées aux cellules souches leucémiques (CSL) sont dans la majorité des cas difficiles à prédire.

Mon travail de thèse a consisté en l'étude de deux marqueurs de mauvais pronostic, liés aux CSL :

1/ ABCB1, membre de la famille des transporteurs *ATP Binding Cassette*, connu pour son implication dans la chimiorésistance et

2/ CD81, une tétraspanine, pour laquelle nous avons démontré l'impact pronostique dans les LAM.

Méthodes

1/ ABCB1 : nous avons évalué la relation entre l'activité d'ABCB1 et les caractéristiques cliniques, ainsi que la réponse aux chimiothérapies dans une cohorte de 321 patients atteints de LAM. Nous avons exploré l'association entre l'activité d'ABCB1 et la chimiorésistance *ex vivo*, l'expression génique et évalué l'effet d'un inhibiteur d'ABCB1.

2/ CD81 : l'élaboration de lignées cellulaires ayant une expression différentielle de CD81, soit par surexpression de l'ADNc ; soit par sous-expression *via* des shARN nous a permis d'étudier la chimiorésistance, la prolifération, l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaires. Par microscopie confocale, nous avons étudié la morphologie cellulaire.

Des souris NSG ont été injectées avec ces modèles pour étudier la prise de greffe, le *homing* et l'invasion tumorale.

D'autre part, nous avons xénotreffé des cellules de patients (PDX) pour étudier l'association entre l'expression de CD81 sur les blastes et la prise de greffe.

Résultats

1/ L'activité d'ABCB1, observée dans 58% des LAM était associée à une moindre leucocytose, une plus forte expression de CD34, une absence de mutations *FLT3-ITD* ou *NPM1* et à une moindre survie globale et sans événement. Néanmoins, l'activité ABCB1 n'aboutissait pas directement à une chimiorésistance aux anthracyclines *ex vivo*. La corrélation entre l'expression d'*ABCB1* et celle des gènes de *BAALC*, *CD34*, *CD200* et *CD7*, suggère que l'expression d'*ABCB1* pourrait être un indicateur indirect des LAM de haut risque. De plus, l'expression d'*ABCB1* était inversement corrélée à celle des gènes de cluster *HOX* et à *CD33*.

2/ Dans les PDX, la prise de greffe était associée à une plus forte expression de CD81 et le temps de prise de greffe était corrélé négativement au niveau d'expression de CD81.

Les PDX avec les lignées modifiées avaient une invasion tumorale augmentée lorsque CD81 était surexprimé.

Aussi, une forte expression de CD81 induisait *in vitro* une plus forte 1) adhésion à la fibronectine et aux fibroblastes, 2) migration et 3) invasion tumorale dans une matrice de gel semi-liquide.

En microscopie confocale, les cellules exprimant plus le CD81 avaient plus de lamellipodes, impliqués dans la migration cellulaire. La chimiorésistance à la daunorubicine était corrélée positivement à l'expression de CD81.

Conclusions

1/ Nous avons démontré l'impact pronostique de l'expression génique, protéique et de l'activité d'ABCB1. De plus, ABCB1 ne serait pas directement impliqué dans la chimiorésistance, son inhibition n'améliorant pas la survie des patients mais plutôt un reflet indirect des formes de LAM de haut risque. Enfin, les patients avec faible expression d'ABCB1 pourraient bénéficier d'un traitement anti-CD33 par gemtuzumab ozogamicin associé à la chimiothérapie conventionnelle.

2/ Une forte expression de CD81 est associée à un moins bon pronostic chez les patients atteints de LAM et dans notre modèle PDX. L'expression de CD81 sur les blastes au diagnostic est associée à une prise de greffe chez les souris NSG, suggérant qu'il pourrait être un marqueur souche. A présent, nous testons un anticorps anti-CD81 comme traitement dans un modèle murin. Une forte expression de CD81 augmente les capacités d'adhésion, de migration et d'invasion, médiées par la formation de lamellipodes et nous nous intéressons à l'implication des voies de signalisation Rac-RhoGTPase.

Table des matières

INTRODUCTION	1
I) La leucémie aiguë myéloïde - une hémopathie hétérogène :	1
II) Les cellules souches leucémiques :	5
III) Rôle du micro-environnement – niche hématopoïétique :	7
IV) Impact pronostique d'un enrichissement en cellules souches leucémiques :	9
V) ATP <i>binding-cassette</i> transporteurs :	11
VI) ABCB1	12
VII) La caractérisation des CSL - enjeu des thérapies ciblées :	14
VIII) CD81 : état des lieux des connaissances actuelles :	15
1. Généralités :	15
2. Immunologie :	16
3. Infectiologie :	18
4. Embryologie	18
IX) Les tétraspanines (TSP) :	18
1. Généralités:	18
2. Rôles des tétraspanines dans les tumeurs solides :	20
3. Rôles des tétraspanines dans les hémopathies malignes :	23
X) Rôle du CD81 en oncologie :	26
1. CD81 et les tumeurs solides (138) :	26
2. CD81 et les hémopathies malignes :	27
XI) Traitements par anticorps anti-CD81 :	28
1. Infectiologie:	28
2. Hématologie:	28
XII) Rôle des tétraspanines et du CD81 dans la sécrétion des exosomes :	30
XIII) Impact pronostique de l'expression du CD81 dans les LAM de l'adulte <i>de novo</i> – travaux préliminaires :	35
OBJECTIFS	39
MATERIELS ET METHODES	43
I) Obtention des modèles cellulaires ayant une expression différentielle du CD81 :	43
1. Lignées cellulaires :	43
2. Transduction des cellules pour permettre un suivi en bioluminescence :	44
3. Obtention d'un modèle stable de surexpression du CD81 par transfections :	44
4. Obtention de deux modèles de sous expression de CD81 par transduction lentivirale de shARN :	45
II) Vérification du niveau d'expression de CD81 sur les différentes lignées cellulaires obtenues :	46
1. Cytométrie en flux :	46
2. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) :	47

3.	Western blot :.....	47
III)	Utilisation d'anticorps bloquants anti-CD81 :	48
IV)	Etude de la chimiosensibilité par test de viabilité MTS :.....	49
V)	Etude de la prolifération cellulaire :.....	50
1.	Comptage par cytométrie en flux :.....	50
2.	Tests de clonogénicité :.....	50
VI)	Etude de l'adhésion cellulaire :.....	50
1.	Adhésion à la fibronectine :	50
2.	Adhésion aux cellules HS-5 en co-culture :.....	51
3.	Adhésion aux laminines :.....	51
VII)	Eude de la migration cellulaire :	52
VIII)	Etude de l'invasion cellulaire :	53
IX)	Analyse morphologique des cellules :	54
1.	Par cytométrie en flux :.....	54
2.	Par microscopie confocale :	54
X)	Modèles <i>in vivo</i> :.....	55
1.	Animaux:.....	55
2.	Etude de la prise de greffe des lignées cellulaires modifiées :	56
3.	Etude de la prise de greffe des cellules de patients LAM au diagnostic :.....	57
4.	Etude de l'invasion tumorale au sacrifice :	57
5.	Etude de l'envahissement tumoral par immuno-histochimie :.....	58
6.	Traitement des cellules par anticorps anti-CD81 avant xénogreffes :.....	58
XI)	Etude des exosomes :.....	59
1.	Isolation des vésicules extracellulaires:	59
2.	Quantification des vésicules extracellulaires :.....	60
XII)	Analyses statistiques :.....	61
RESULTATS		63
I)	Evaluation de l'expression basale du CD81 dans les différentes lignées cellulaires :.....	64
	64
II)	Validation des 3 modèles d'expression différentielle de CD81 :	65
III)	Etude de la chimiosensibilité :	66
IV)	Impact de l'expression de CD81 sur la prolifération cellulaire :.....	67
V)	Impact de l'expression de CD81 sur l'adhésion cellulaire :.....	69
1.	Adhésion cellulaire à la fibronectine :	69
2.	Adhésion cellulaire en co-culture :.....	70
3.	Adhésion aux laminines :.....	71
VI)	Impact de l'expression de CD81 sur la migration :	72
VII)	Impact de l'expression de CD81 sur l'invasion cellulaire :	73
VIII)	Etude morphologique et expression de CD81 :	74

1.	Diamètre cellulaire :	74
2.	Circularité :	76
IX)	Association entre expression de CD81 et prise de greffe :	77
1.	Dans les xénogreffes obtenues avec les lignées modifiées :	77
2.	Dans les xénogreffes obtenues avec les blastes de patients LAM :	79
X)	Association entre expression de CD81 et envahissement leucémique :	80
XI)	Etude du <i>homing</i> :	82
XII)	Effet du blocage des cellules avant xénogreffe par l'anticorps anti-CD81 sur l'envahissement :	83
XIII)	Impact de l'expression du CD81 sur la sécrétion des exosomes :	84
	DISCUSSION.....	87
I)	Etude d'ABCB1 dans la LAM :	87
1.	Association ABCB1 et survie : par quels mécanismes ?	87
2.	Quelles cibles pour ABCB1 ?	88
3.	ABCB1 : marqueur de CSL ?	89
II)	Etude de CD81 dans les LAM :	90
1.	Discussion des modèles investis :	91
2.	Etude des mécanismes potentiellement impliqués dans le rôle de CD81 au cours de la leucémogénèse des LAM :	93
3.	Modification du cytosquelette membranaire :	97
4.	Effets de l'augmentation des capacités d'adhésion et de migration <i>in vivo</i> :	98
5.	Association entre l'expression de CD81 et la sécrétion d'exosomes :	99
6.	Hypothèses mécanistiques et perspectives pour l'étude des voies de signalisation :	100
	PERSPECTIVES.....	103
	CONCLUSIONS.....	105
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107
	ANNEXE I.....	129
	ANNEXE II	130
	ANNEXE III.....	132

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Table des figures

Figure 1 : Modélisation de l'hématopoïèse normale et leucémique.	2
Figure 2 : Modèles d'hétérogénéité tumorale dans les LAM.....	3
Figure 3 : Classification ELN pour la stratification thérapeutique des patients atteints de LAM.	4
Figure 4 : Les cellules souches leucémiques	6
Figure 5 : Représentation de la niche hématopoïétique.....	8
Figure 6 : Pistes thérapeutiques potentielles pour cibler les CSL.....	11
Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme d'action d'ABCB1 dans la chimiorésistance..	13
Figure 8 : Schéma de la structure de CD81.....	16
Figure 9 : Schéma du rôle de CD81 sur les lymphocytes B.....	17
Figure 10 : CD81 a un rôle dans la migration des cellules dendritiques via la formation de lamellipodes médiée par Rac1	17
Figure 11 : Rôle de CD81 dans l'hépatite C.....	18
Figure 12 : Arbre phylogénétique des tétraspanines.....	19
Figure 13 : Structure générale des tétraspanines.....	19
Figure 14 : Schéma de microdomaine enrichi en tétraspanines (TEM)	20
Figure 15 : Schéma représentant le mécanisme d'action de CD151 dans le cancer du sein et le mélanome	22
Figure 16 : Schéma modélisant le mécanisme d'action de CD9 sur la migration cellulaire via l'activation de Rac1	24
Figure 17 : Proposition de mécanisme d'action de la tétraspanine 3 (Tspan 3) dans la leucémogénèse myéloïde.....	26
Figure 18 : L'immunothérapie anti-CD81 par l'anticorps 5A6 diminue la progression tumorale et augmente la survie dans un modèle murin de lymphome B.....	29
Figure 19 : La genèse des exosomes.....	31
Figure 20 : Schéma représentant une hypothèse de remodelage du microenvironnement par les exosomes dérivés des blastes de LAM.	34
Figure 21 : Courbes de survie stratifiées sur l'expression médullaire du CD81 au diagnostic pour (A) la survie globale (OS), (B) la survie sans rechute (RFS) sur la cohorte de 134 patients atteints de LAM.....	36
Figure 22 : Schéma du plasmide CD81 transfecté	45
Figure 23 : Schéma de structure des plasmides lentiviraux contenant les shARN CD81	46
Figure 24 : Schéma représentant le plan expérimental pour les tests de migration cellulaire	53
Figure 25 : Schéma représentant le plan expérimental pour les tests d'invasion cellulaire .	54
Figure 26 : Protocole expérimental du modèle animal utilisé	56
Figure 27 : Schéma du plan expérimental utilisé pour l'isolation des vésicules extracellulaires (VEs).....	59
Figure 28 : Profil d'expression du CD81 à l'état basal sur les lignées cellulaires de LAM en cytométrie en flux.....	64
Figure 29 : Expression différentielle de CD81 en fonction des lignées cellulaires utilisées .	65
Figure 30 : Etude de la chimiosensibilité en fonction de l'expression de CD81.	66
Figure 31 : L'expression de CD81 n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire.....	68
Figure 32 : L'expression de CD81 est corrélée à l'adhésion cellulaire à la fibronectine.	69
Figure 33 : Tests d'adhésion à la fibronectine avec cellules 81- en milieu conditionné 81+ (A) et après blocage des cellules CD81+ par un anticorps bloquant (B).....	70
Figure 34 : L'expression de CD81 est corrélée à l'adhésion cellulaire en co-culture avec des fibroblastes HS-5.....	71

Figure 35 : Adhésion cellulaire aux différents isoformes de laminine et expression de CD81	72
Figure 36 : Association entre expression forte de CD81 et migration cellulaire augmentée vers les fibroblastes	73
Figure 37 : Association entre forte expression de CD81 et invasion cellulaire augmentée vers les fibroblastes	74
Figure 38 : L'expression de CD81 est associée au diamètre cellulaire.....	75
Figure 39 : L'expression de CD81 impacte sur la morphologie cellulaire	77
Figure 40 : L'expression de CD81 est liée à une prise de greffe plus précoce.....	79
Figure 41 : Prise de greffe des PDX en fonction du pourcentage de blastes CD81+ au diagnostic chez les patients atteints de LAM	80
Figure 42 : L'expression de CD81 est liée à l'envahissement tumoral dans les xénogreffes	81
Figure 43 : Etude immunohistochimique de l'envahissement blastique dans le modèle de surexpression U-937	82
Figure 44 : Etude du homing en fonction de l'expression de CD81	83
Figure 45 : Effet du blocage par anticorps anti-CD81 sur les cellules avant xénogreffes dans des souris immunodéficientes	84
Figure 46 : L'expression de CD81 est associée à une sécrétion d'exosomes plus importante.....	85
Figure 47 : Représentation schématique de mes hypothèses mécanistiques expliquant le rôle pronostique de CD81 dans les LAM	101

Table des tableaux

Tableau I : Rôle des tétraspanines dans les tumeurs solides	21
Tableau II : Exemples de tétraspanines utilisées comme cibles thérapeutiques en oncologie.....	23
Tableau III : Caractéristiques des patients et association en analyse univariée entre l'expression de CD81 et plusieurs facteurs pronostiques	35
Tableau IV : Association entre l'expression de CD81 et la survie en analyse multivariée ...	36
Tableau V : Milieux de culture utilisés en fonction des lignées cellulaires	38
Tableau VI : Caractéristiques des quatre shARN choisis pour l'infection	46
Tableau VII : Récapitulatif des différents anticorps utilisés pour les marquages en cytométrie en flux avec les quantités utilisées.....	47

Table des annexes

Annexe I : Article : " Boyer T, Gonzales F, Barthélémy A, Marceau-Renaut A, Peyrouze P, Guihard S, et al. Clinical Significance of ABCB1 in Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Study. <i>Cancers (Basel)</i> . 6 sept 2019;11(9).....	129
Annexe II : Targeting aberrant expression of CD81 impacts cell adhesion and migration, drug resistance and prognosis of acute myeloid leukemia.....	130
Annexe III : Article "Boyer T, Gonzales F, Plesa A, Peyrouze P, Barthelemy A, Guihard S, et al. Flow Cytometry to Estimate Leukemia Stem Cells in Primary Acute Myeloid Leukemia and in Patient-derived-xenografts, at Diagnosis and Follow Up. <i>J Vis Exp</i> . 26 mars 2018;(133).....	132

Liste des abréviations

ABC : ATP Binding Cassette	GO : gemtuzumab ozogamicin
ADCC : Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity	GOELAMS : Groupe Ouest-Est des Leucémies Aigües et Maladies du Sang
ADCP : Antibody-Dependant Cellular Phagocytosis	HR : hazard ratio
ADN : acide désoxyribonucléique	IC : concentration inhibitrice médiane
APC : allophycocyanin	IL : Interleukine
ARN : acide ribonucléique	IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium
BC : Beckman-Coulter	IRCL : Institut pour la recherche sur le cancer de Lille
BD : BD Biosciences®	IV : intraveineux
BME : Basement Membrane Matrix	JAK : Janus kinase
BSA : albumine de sérum bovin	KO : knockout
CBF : Core-binding factor	LAL : leucémie aiguë lymphoblastique
CD : cluster de différenciation	LAM : leucémie aiguë myéloïde
CIL : cellules initiatrices de leucémie	LMC: Leucémie Myéloïde Chronique
CLL-1 : C-type lectin like molecule-1	MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
CMF : cytométrie en flux	MDR : multi-drug resistance
CR : complete remission	MOI : multiplicity of infection
CSH : cellules souches hématopoïétiques	MRD : Minimal residual disease
CSL : cellules souches leucémiques	MT1-MMP : membrane-type-1 matrix metalloproteinase
CXCL-12 : C-X-C motif chemokine 12	MTS : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4	NK : natural killer
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole	NOD-SCID : Non Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency
DFS : disease free survival	NPM1 : Nucleophosmin 1
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium	NS : non significatif
EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique	NSG : NOD/SCID/IL-2R γ cnnull
EFS : Event-free survival	NTA : Nanoparticle Tracking Analysis
ELN : European Leukemia Net	OS : Overall survival
EOPS : exempt d'organisme pathogène spécifique	PBS : tampon phosphate salin (phosphate buffer saline)
ERK : Extracellular signal-regulated kinases	PCR : polymerase chain reaction
FITC : fluorescein isothiocyanate	PDX : patient derived xenograft
FLT3-ITD : Fms-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication	PE : Phycoerythrin
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	PEs : particules extracellulaires
GM-CSF : Granulocyte Macrophage ColonyStimulating Factor	PI3K : Phosphoinositides-3 Kinases
	PKC α : Protéine kinase C alpha
	RFS : Relapse-free survival

RPMI : Roswell Park Memorial Institute
medium
SC : Santa Cruz Technologies®
SCID : Severe Combined
Immunodeficiency
shARN : short hairpin acide
ribonucléique
SL-IC : SCID-Leukemia Initiating Cells
SVF : sérum de veau fœtal
TAPA-1 : target of the antiproliferative
antibody 1
TBS : tris-buffered saline
TEM/TERMS : microdomaines enrichis
en tétraspanines
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TIM-3 : T-cell immunoglobulin and
mucindomain containing-3
TSP : tétraspanines
UCD : ultracentrifugation différentielle
VEs : vésicules extracellulaires
VHC : virus de l'hépatite C
WB : western blot

Introduction

l) La leucémie aiguë myéloïde - une hémopathie hétérogène :

L'hématopoïèse est un ensemble de mécanismes impliqués dans le renouvellement des cellules sanguines afin de maintenir un pool de cellules centrales et circulantes fonctionnelles.

Ce processus finement régulé est initié par des cellules souches hématopoïétiques (CSH) aux propriétés multiples : auto renouvellement, prolifération, différenciation, quiescence et « *homing* » (1). La dérégulation de l'homéostasie du tissu hématopoïétique peut aboutir à la survenue d'hémopathies. Parmi celles-ci, la leucémie aiguë myéloïde (LAM) a une incidence de 3,8 cas pour 100 000 habitants par an (2–4).

Les LAM sont caractérisées par la prolifération clonale anarchique dans la moelle osseuse, de blastes myéloïdes tumoraux. Ils sont constitués par 1/ une minorité de cellules appelées cellules initiateuses de leucémie (CIL) ou cellules souches leucémiques (CSL) possédant des propriétés semblables aux CSH et 2/ une majorité de cellules leucémiques bloquées à un stade donné de la différenciation hématopoïétique qui prolifèrent sans poursuivre leur maturation (5) (

Figure 1).



Figure 1 : Modélisation de l'hématopoïèse normale et leucémique.

Des expériences de xéno greffes dans des souris immunodéficientes (NOD/SCID) ont permis d'identifier une population cellulaire « SCID-repopulating cells » (SRC), capables d'induire une hématopoïèse normale. Les SRC, immatures, s'engagent ensuite dans des voies de différenciation variées pour donner naissance, via un pool de progéniteurs multipotents aux différentes familles de globules matures physiologiques. De la même manière, dans l'hypothèse d'un modèle hiérarchique, la leucémogénèse myéloïde sous-entend l'existence d'une cellule souche (SL-IC), qui, sous l'influence d'un événement leucémique, devient anarchique, capable d'auto-renouvellement et aboutit, chez des souris immunodéficientes à un clone de progéniteurs myéloïdes puis à des blastes.

D'après (6)

L'hématopoïèse leucémique peut être expliquée par deux modèles (7) (Figure 2).

1/ Le modèle stochastique, dans lequel la combinaison aléatoire de facteurs intrinsèques et extrinsèques détermine l'émergence d'une cellule leucémique. Ce caractère aléatoire rend la prédiction impossible.

2/ Le modèle hiérarchique, dans lequel la leucémogénèse mimerait l'hématopoïèse physiologique. Dans ce modèle, la présence de CSL est implicitement obligatoire, ces cellules étant à l'origine de la leucémogénèse.

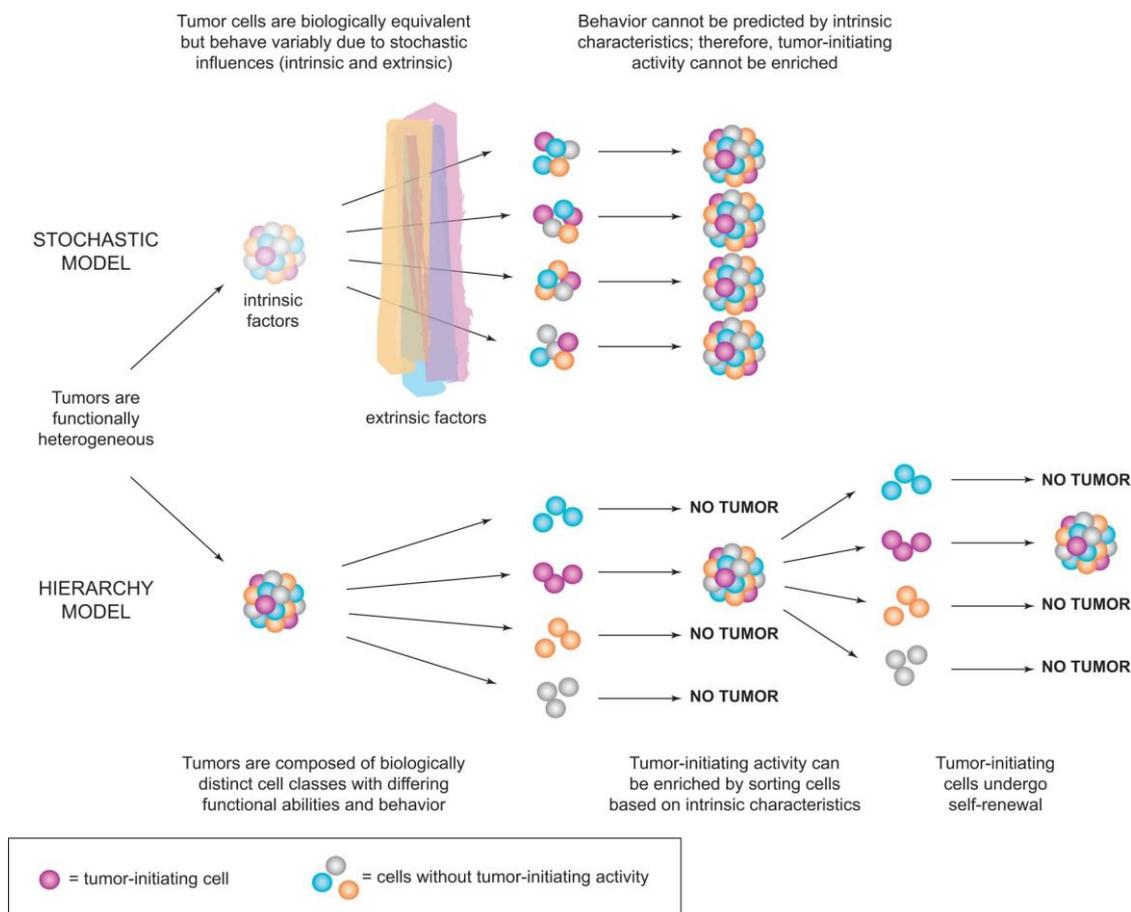


Figure 2 : Modèles d'hétérogénéité tumorale dans les LAM
D'après (7)

La LAM est une entité très hétérogène, à la fois sur le plan clinique avec une grande variabilité inter-individuelle de la symptomatologie initiale et de réponse aux traitements, avec une survie à 5 ans allant de 10% chez les sujets âgés à 60% chez l'enfant et le jeune adulte (2,4). Il existe également une hétérogénéité biologique avec huit sous-types cytologiques et des caractéristiques immuno-phénotypiques, cytogénétiques et moléculaires différentes selon les patients (8,9). Malgré cette hétérogénéité, le traitement est identique et repose sur une chimiothérapie à base d'anthracyclines (inhibiteurs de l'activité topoisomérase II et de la prolifération cellulaire) et d'Aracytine (inhibiteur sélectif de la synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire), souvent complétée par une allogreffe de CSH. Actuellement, la prise en charge thérapeutique au diagnostic en Europe repose sur une stratification pronostique incluant uniquement le caryotype et la recherche de mutations en biologie moléculaire : la classification European LeukemiaNet (ELN) (10) (**Figure 3**). Un autre facteur de risque indépendant majeur dans la prise en charge des LAM est

la réponse au traitement, mise en évidence par la mesure de la maladie résiduelle (MRD) réalisée soit en biologie moléculaire soit par cytométrie en flux (11,12).

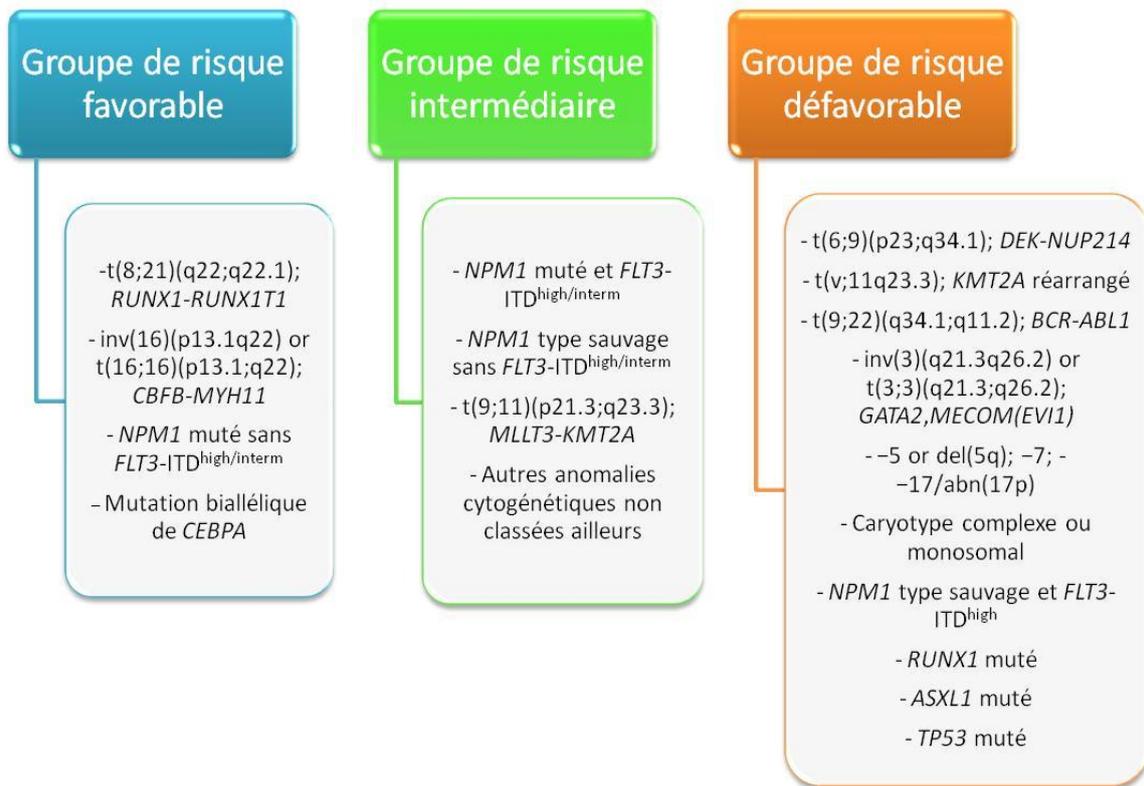


Figure 3 : Classification ELN pour la stratification thérapeutique des patients atteints de LAM.

D'après Döhner H et al. (10)

Cette classification est imparfaite puisque la réponse aux traitements et le pronostic peuvent être très variables au sein d'un même groupe de risque et que 2/3 des patients sont classés dans le groupe intermédiaire. Il apparaît donc évident qu'un des axes majeurs de recherche garantissant une amélioration de la prise en charge des patients soit la découverte de nouveaux marqueurs pronostiques.

Une des pistes de recherche s'est révélée avec le développement des modèles de xénogreffes. En effet, les expériences de xénogreffes de cellules leucémiques humaines dans des souris immunodéficientes (*Patient-derived-xenograft (PDX)*) ont

permis d'identifier une population cellulaire capable d'induire une leucémogénèse. Ces cellules nommées « cellules initiatrices de leucémie » (CIL) ont été fonctionnellement définies comme des « cellules souches leucémiques » (CSL) (**Figure 4**) (13,14).

II) Les cellules souches leucémiques :

Les termes « cellules souches leucémiques » (CSL) ou « cellules initiatrices de leucémie » (CIL) sont utilisés pour définir la population de cellules capables d'initier une leucémogénèse chez des souris immunodéficientes (NOD-SCID par exemple) (7). Dans un souci de compréhension, nous parlerons dans ce manuscrit de « cellules souches leucémiques » (CSL).

Dans les tumeurs solides, la notion de cellules « souches/initiatrices de tumeur » est également décrite, notamment dans les cancers du sein, du colon ou encore les tumeurs cérébrales (15). Dans les LAM, la proportion estimée des CSL est faible, variant entre 0.28% et 0.00002% de la population leucémique totale selon le modèle utilisé (16). Celles-ci seraient proches des CSH et posséderaient des propriétés similaires permettant le renouvellement du réservoir de blastes ; elles seraient le reflet de la maladie résiduelle et pourraient induire les rechutes (**Figure 4**) (17).

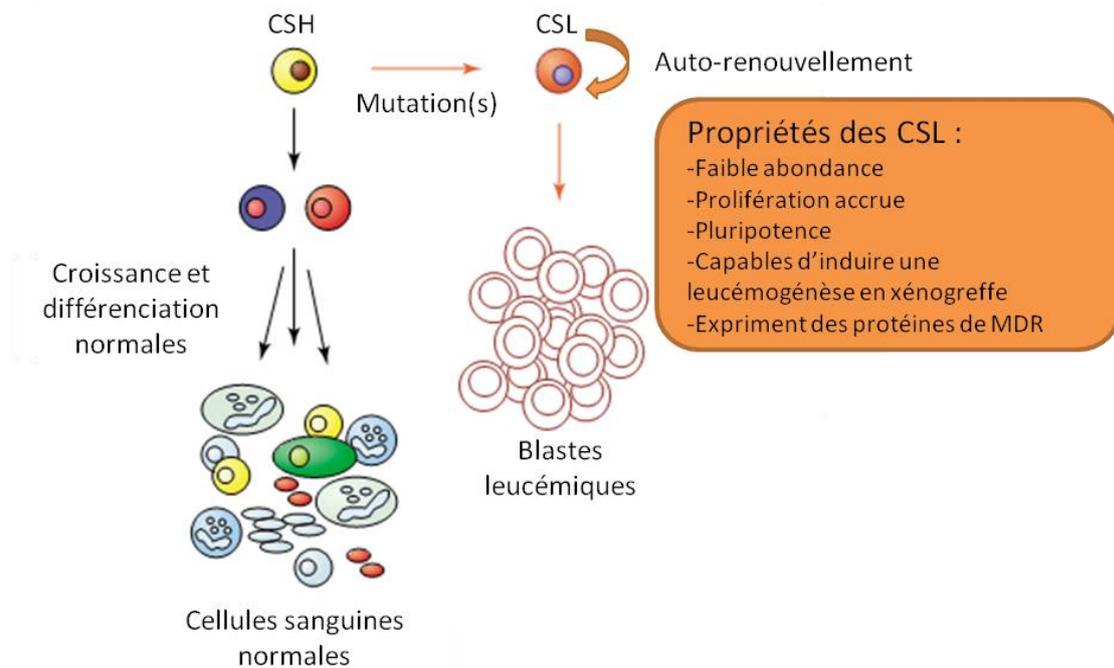


Figure 4 : Les cellules souches leucémiques

Schéma représentant à gauche l'hématopoïèse normale, à droite la leucémogénèse avec les principales propriétés des cellules souches leucémiques (CSL). MDR = multi-drug resistance.

Schéma adapté d'après (17)

Les CSL sont hétérogènes d'un patient à l'autre et bien que divers travaux de recherche aient montré la valeur pronostique d'un enrichissement en CSL au diagnostic, il n'existe pas en 2019 de consensus pour les caractériser, notamment par l'utilisation de marqueurs membranaires. Il n'est donc pas possible à l'heure actuelle de les cibler.

Historiquement, seule l'association $CD34^+/CD38^-$ était admise comme caractéristique des CSL car des expériences de xénogreffe de blastes myéloïdes sur souris immunodéficientes ont montré une prise de greffe uniquement à partir des fractions blastiques $CD34^+/CD38^-$ (6,18,19). Cependant, de nombreux travaux ont montré que les fractions $CD34^-$ et/ou $CD34^+CD38^+$ pouvaient également initier une leucémogénèse chez la souris (20–22).

De plus, la combinaison des marqueurs $CD34^+/CD38^-$ définit une population très hétérogène ; ces marqueurs étant partagés par les CSL et les CSH.

Plusieurs autres marqueurs potentiels de CSL ont été étudiés tels que le CD90 (exprimé par les CSH mais non par les CSL) (23,24), le CD123 (25), CLL-1 (26), CD97 (27) ou TIM-3 (28), mais aucun n'a fait la preuve de sa spécificité.

Par exemple, le Groupe Ouest-Est des Leucémies Aiguës et Maladies du Sang (GOELAMS) a montré que l'expression du CD123 (chaîne α du récepteur de l'IL-3) est associée à un mauvais pronostic lorsqu'il est exprimé dans plus de 1% des blastes CD34⁺/CD38⁻ au diagnostic (29). Ces données n'ont pour l'instant pas été confirmées par d'autres études. Il n'y a donc actuellement aucun consensus sur l'immunophénotype des CSL et leur définition reste fonctionnelle.

Afin de mieux définir cette population, Kersten *et al.* et Goardon *et al.* ont montré que l'utilisation des marqueurs CD90 et CD45RA, en association au CD34 et CD38 permettait de faire la distinction entre la population de CSH (CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻), les progéniteurs multipotents physiologiques (CD34⁺CD38⁻CD90^{dim}CD45RA⁻) et les blastes myéloïdes (CD34⁺CD38⁻CD90⁻CD45RA⁺) dans la majorité des LAM (30,31).

Dans l'équipe, nous avons montré que l'utilisation de cette combinaison d'anticorps pourrait permettre une approche des CSL chez certains patients puisque les blastes récupérés après PDX expriment ces marqueurs phénotypiques. De plus, nous avons montré la faisabilité de la détermination de cette population au diagnostic et son suivi en maladie résiduelle par cytométrie en flux (32).

Au niveau moléculaire, une étude transcriptomique des fractions CSL⁺ versus CSL⁻ chez 78 patients atteints de LAM a permis d'établir une signature « souche » appelée LSC17 (33). Cette signature a été validée comme ayant un impact pronostique sur 5 cohortes indépendantes.

III) Rôle du micro-environnement – niche hématopoïétique :

La niche hématopoïétique est un site anatomique microscopique composé, entre autres, de cellules mésenchymateuses souches et progéniteurs, ostéoblastes, de capillaires sinusoides, adipocytes dans laquelle sont sécrétés de multiples facteurs de croissance, d'adhésion et de chimiokines. La niche a un rôle essentiel dans le

maintien et le renouvellement des CSH et permet le maintien d'une hématopoïèse normale. La proportion de CSH quiescentes est finement régulée tout au long de l'existence.

Il existerait deux types de niches :

- La niche ostéoblastique qui contiendrait les ostéoblastes, et leurs précurseurs, lesquels produisent des facteurs ayant la capacité de réguler la quiescence et la persistance des CSH, tels que l'angiopoïétine, l'ostéopontine, la thrombopoïétine (TPO) et la chimiokine CXCL-12 (SDF-1).
- La niche vasculaire, composée de cellules réticulaires et endothéliales, assure non seulement la vascularisation médullaire *via* les capillaires sinusoides médullaires mais aussi la régulation de l'hématopoïèse.

Les CSH se situeraient dans la région endostéale ; région adjacente aux ostéoblastes et à la région vasculaire (34,35) (**Figure 5**).

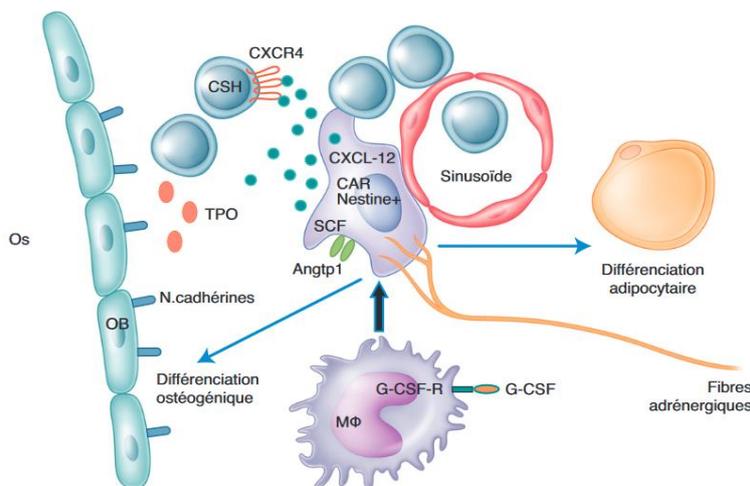


Figure 5 : Représentation de la niche hématopoïétique.

Abréviations :

*OB : ostéoblastes,
MΦ : macrophages,
CAR : cellules réticulaires,
TPO : thrombopoïétine
D'après (35)*

Il est supposé que les CSL, pouvant conduire aux rechutes de LAM, résideraient dans la niche hématopoïétique, et plus particulièrement dans la région endostéale, où elles seraient protégées de l'action des chimiothérapies (37). Ceci a été démontré par un modèle de xénogreffe (37).

Il y aurait donc une communication importante entre les CSL et le micro-environnement médullaire, et les cellules leucémiques auraient la capacité de modifier le micro-environnement, à leur avantage, créant ainsi « une niche leucémique », favorable à leur prolifération (38).

IV) Impact pronostique d'un enrichissement en cellules souches leucémiques :

Plusieurs études mettent en évidence le lien entre la fréquence des CSL au diagnostic, leur persistance et la survie du patient.

Une des hypothèses mécanistiques serait la relation entre un enrichissement en CSL et la chimiorésistance des blastes; notamment par le fait que les CSL seraient quiescentes et donc pourraient échapper à l'action des chimiothérapies (37,39). L'équipe de Saito a testé la chimiosensibilité à l'Aracytine des cellules en fonction de leur phénotype CD34/CD38 et leur phase dans le cycle cellulaire : les cellules CD34+CD38- avaient une proportion de cellules en phase G0 plus importante par rapport aux cellules CD34+CD38+ et les cellules en phase G0 étaient plus chimiorésistantes à l'Aracytine (39). Ceci était conforté par le fait que les cellules CD34+CD38- se trouvent préférentiellement dans la zone endostéale de la moelle osseuse, zone comprenant un index de prolifération, visualisé en immunohistochimie par un marquage ki67, très faible.

Pour corroborer cette hypothèse, l'équipe du Docteur Schuurhuis a montré une association entre un pourcentage élevé de blastes CD34+/CD38- au diagnostic et 1/ une maladie résiduelle plus élevée après chimiothérapie 2/ un taux élevé de rechutes et 3/ une diminution de la survie (40). L'équipe du Docteur Ebinger a confirmé ces résultats chez l'enfant (41).

Les LAM sont également hétérogènes du point de vue génétique entre les différents patients. Cette hétérogénéité génétique est visible dans les expériences de xénogreffes puisque dans certains sous types de LAM (notamment les LAM avec translocations t(8;21) et inversion 16, regroupées sous le terme « Core-binding Factor » (CBF) ou les LAM3), les cellules injectées aboutissent difficilement à une leucémie chez leurs hôtes (14).

L'hétérogénéité génétique est également présente chez un même patient. En effet, la présence de divers variants alléliques a permis de montrer la présence de plusieurs sous-clones leucémiques dans des proportions variées (42). De même, dans la moelle osseuse (MO) de souris greffées à partir de cellules de MO de patients atteints

de LAM (PDX), on peut retrouver ces différents sous-clones, même s'il existe fréquemment un sous-clone majoritaire responsable de la prise de greffe (43). Dans certains cas, il peut y avoir une discordance entre les fréquences des variants alléliques du patient et du PDX correspondant, suggérant que l'hétérogénéité de prise de greffe pourrait être liée aux caractéristiques génétiques des différents sous-clones (44).

Plusieurs études montrent une association entre prise de greffe chez les souris NOD/SCID et mauvais pronostic chez les patients (40,45) et nous pensons que cela pourrait être lié aux caractéristiques des CSL.

Des pistes thérapeutiques intéressantes pour le traitement des LAM seraient donc de mieux cibler les CSL en prenant en compte à la fois les caractéristiques propres de ces cellules (mécanisme de résistance de multi-drug resistance, marqueurs de surface caractéristiques des CSL, dérèglement des voies de signalisation) et leur micro-environnement (*Figure 6*).



Figure 6 : Pistes thérapeutiques potentielles pour cibler les CSL

Dans l'équipe, nous nous sommes intéressés aux deux premières pistes, afin de cibler les CSL, à savoir :

- Mieux comprendre les phénotypes de résistance, à travers notamment la protéine ABCB1
- Rechercher un marqueur membranaire spécifique pouvant être lié au CSL et appréhender sa fonctionnalité afin de pouvoir le cibler.

V) ATP binding-cassette transporteurs :

Un enrichissement en CSL pourrait expliquer les phénomènes de chimiorésistance que l'on peut observer chez certains patients.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés aux protéines de la famille des transporteurs ATP *binding cassette* (ABC).

Cette famille compte 49 membres divisés en sept sous-classes identifiées par les lettres A à G. Leur structure commune est composée d'un à trois segments hydrophobiques transmembranaires, et d'un domaine intracellulaire de liaison à l'ATP ou nucléotide « *binding folds* » (NBF), dont la séquence en acides aminés détermine l'appartenance aux sous-classes préalablement citées. Ces protéines ont un rôle d'efflux de molécules endogènes et exogènes par un processus « énergie-dépendant » impliquant la liaison et l'hydrolyse de l'ATP *via* le domaine NBF. De façon non exhaustive, ces substrats incluent des agents chimiothérapeutiques, des ions métalliques, des peptides, des acides aminés, des hydrates de carbone (46,47). L'exploration des fonctions des transporteurs ABC du point de vue physiologique ou dans les cellules cancéreuses démontre l'implication de certains membres de cette famille dans la maintenance de l'immaturité des cellules souches et dans la chimiorésistance de certains cancers. Les exemples les plus documentés dans la littérature sont les protéines ABCG2 et ABCB1.

VI) ABCB1

ABC *subfamily B-member 1* (ABCB1), aussi connue sous le nom de P-glycoprotéine (P-gp) ou *multi-drug resistance 1* (MDR1), confère aux cellules cancéreuses qui l'expriment un phénotype de résistance aux drogues ; notamment aux anthracyclines, pierre angulaire du traitement des LAM (48,49) (*Figure 7*).

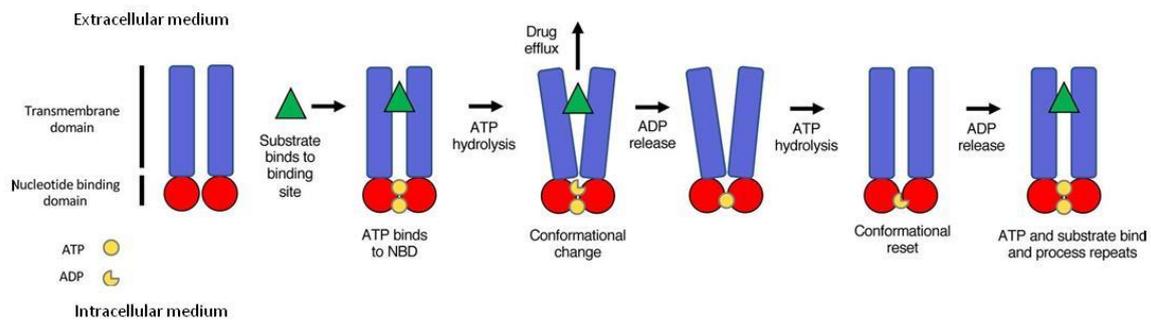


Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme d'action d'ABCB1 dans la chimiorésistance.

1. Fixation du substrat sur les domaines transmembranaires du transporteur « ouvert »
 2. Rapprochement des « Nucleotid binding domain » et fixation de 2 molécules d'ATP.
 3. Passage du transporteur sous sa forme fermée.
 4. Ouverture du transporteur du côté extracellulaire.
 5. Expulsion du substrat.
 6. Hydrolyse des 2 molécules d'ATP.
 7. Passage du transporteur sous sa forme ouverte et le processus peut recommencer
- D'après (48)

Environ 50% des patients atteints de LAM expriment ABCB1 à la surface de leur blastes (49). Or, il a été montré qu'une surexpression d'ABCB1 était associée à un taux plus faible de rémission complète et un taux de rechutes plus élevé chez les patients traités par les protocoles de chimiothérapie conventionnelle comprenant une association anthracyclines-cytarabine (49–52). Après exposition *ex-vivo* à la Daunorubicine, il était retrouvé une corrélation inverse significative entre l'expression d'ABCB1 et les concentrations de chimiothérapie intracellulaire. Or, une faible concentration de Daunorubicine intracellulaire était corrélée à un taux de rechutes plus élevé (53).

Chez ces patients à fort niveau d'expression d'ABCB1, l'Idarubicine pouvait être proposée comme anthracycline en alternative à la Daunorubicine, avec des taux de rémission complète supérieurs à ceux obtenus avec la Daunorubicine, essentiellement chez les patients du groupe de cytogénétique favorable ou intermédiaire (54).

De plus, une forte expression d'ABCB1 et une faible expression de CD33, sont associées à de moins bonnes réponses au gemtuzumab ozogamicin (GO) (Mylotarg®) (55). Cette molécule, utilisée dans le traitement des LAM, est constituée d'un anticorps monoclonal anti-CD33 humanisé, associé par une liaison covalente à une molécule cytotoxique, la calichéamicine, responsable de l'activité anti-tumorale (55). Ainsi, le profil d'expression d'ABCB1 s'avère être une donnée importante afin de permettre une prise en charge thérapeutique optimale des patients atteints de LAM.

D'autant plus que certaines molécules, agissant comme des inhibiteurs compétitifs d'ABCB1, telles que la quinine ou la ciclosporine A, ont été décrites comme pouvant réverser le phénotype de *multi-drug resistance* lié à ABCB1 (56). Ces molécules, en association avec les chimiothérapies ont montré une amélioration des taux de survie globale chez les patients de haut risque (57,58), mais cela n'a pas été retrouvé dans toutes les études (59,60).

Des inhibiteurs plus spécifiques d'ABCB1, tel que PSC833 (Valpsodar) n'ont pas montré d'efficacité dans les différents essais cliniques dans lesquels ils ont été testés (61–63), même si une étude montre un bénéfice mineur de cette molécule chez des patients de moins de 45 ans atteints de LAM (64).

La première partie de ce travail sera donc de mieux comprendre le rôle d'ABCB1 dans la LAM et d'en déduire de potentielles pistes thérapeutiques.

Un autre moyen de cibler les CSL est de mieux connaître leurs caractéristiques intrinsèques et, éventuellement, de découvrir des marqueurs spécifiques des CSL pouvant être ciblés, ce qui a fait l'objet de la deuxième partie de mon travail.

VII) **La caractérisation des CSL - enjeu des thérapies ciblées :**

Afin de déterminer de nouveaux marqueurs de CSL, nous nous sommes intéressés à leurs propriétés intrinsèques connues. Une des caractéristiques majeures des CSL est la quiescence. Cette propriété a un intérêt particulier puisqu'elle est liée à la

chimiorésistance, la majorité des molécules utilisées comme chimiothérapies étant principalement actives sur les cellules fortement prolifératives.

En 2004, Venezia *et al.* ont identifié plusieurs gènes différentiellement exprimés dans les CSH en fonction de leur niveau de prolifération *versus* quiescence. Le gène codant pour une tétraspanine, le *CD81* (localisé en 11p15.5) a été identifié dans cette étude comme l'un des plus régulièrement surexprimés dans les CSH dont la prolifération avait été induite (65).

En partant de ce constat, Lin *et al.* ont montré, à l'aide d'un modèle murin *CD81* KO, une diminution de la capacité des CSH murines *CD81*^{-/-} à entraîner une prise de greffe lorsqu'elles sont injectées dans des souris *wild type* (WT) irradiées et, *in vitro*, un plus long délai pour retrouver un état de quiescence après un stress cellulaire au 5-Fluorouracile (antimétabolite) en comparaison aux cellules WT (66). Le *CD81* serait donc une protéine essentielle pour maintenir les capacités de quiescence des CSH.

Cette protéine semblait donc être un bon candidat à la caractérisation des CSL.

VIII) CD81 : état des lieux des connaissances actuelles :

1. Généralités :

Vaickus *et al.* ont développé en 1985 des anticorps monoclonaux dans le but d'inhiber la croissance des lymphocytes (67). En 1990, Oren *et al.* ont identifié l'épitope d'un de ces anticorps inhibant la prolifération des lymphocytes B *in vitro* et l'ont nommé TAPA-1 (*target of antiproliferative antibody 1*), secondairement renommé *CD81* (68). Son poids moléculaire est de 26kDa et il s'agit de la seule tétraspanine non glycosylée (**Figure 8**). La protéine *CD81* est exprimée dans de très nombreux tissus humains. Elle n'est en revanche pas exprimée par les globules rouges, les granulocytes et les plaquettes (69). Initialement étudiée en immunologie, les champs d'implication du *CD81* se sont ensuite élargis vers l'infectiologie, l'embryologie et la cancérologie.

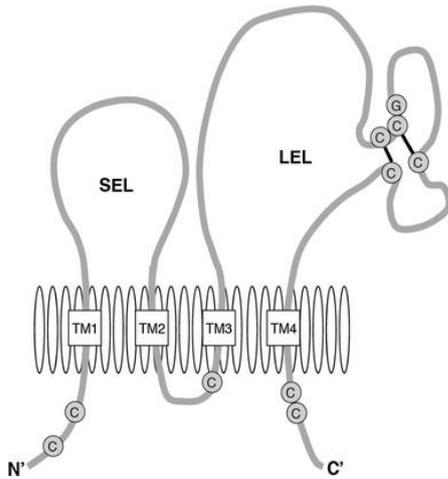


Figure 8 : Schéma de la structure de CD81

Cette structure, comme toutes les tétraspanines inclut 4 domaines transmembranaires (TM) séparant deux boucles extracellulaires : une petite (SEL) et une grande (LEL) contenant un domaine CCG. Les cystéines cytoplasmiques sont les sites de palmitoylation ; alors que les cystéines de la grande boucle forment des ponts disulfures.

D'après (70)

2. Immunologie :

Le CD81 est essentiel à la maturation des lymphocytes B et à la régulation de leur activation. Il est exprimé de façon précoce sur les lymphocytes pré-BII ; permet l'expression de CD19 à la surface des lymphocytes B pour la reconnaissance antigène-anticorps et s'associe au complexe CD19-CD21-leu13 pour former un complexe de transduction du signal (70–72) (**Figure 9**).

Il est également impliqué dans la maturation de la lignée T en aidant à la spécialisation des lymphocytes T doubles négatifs en lymphocytes CD4+ ou CD8+ (73).

Les souris transgéniques CD81^{-/-} ont une diminution d'expression de CD19 à la surface des lymphocytes B ; en revanche, la maturation et la fonction des lymphocytes T ne sont pas altérées (74).

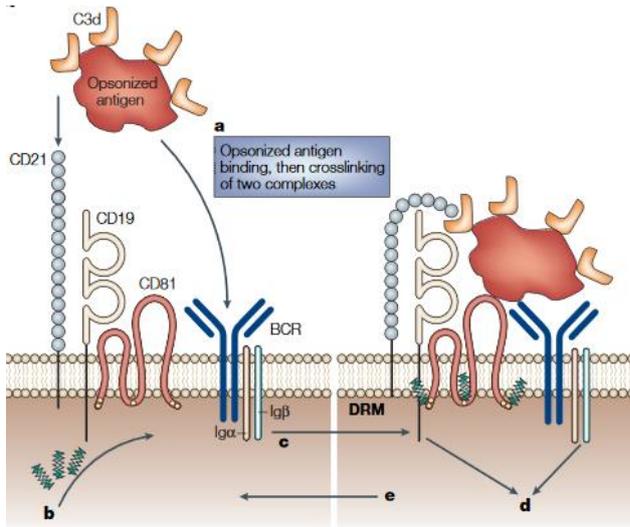
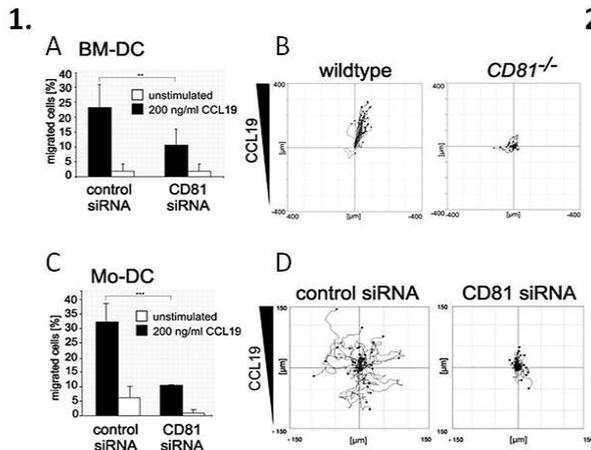


Figure 9 : Schéma du rôle de CD81 sur les lymphocytes B

La reconnaissance d'un antigène opsonisé par son récepteur BCR par le CD21 implique a) une palmitoylation transitoire de CD81 au niveau des résidus cystéines (zigzags verts), b) une stabilisation des complexes moléculaires dans les DRM (detergent resistant microdomains), c) résultant en une signalisation de BCR et CD19

D'après (75)

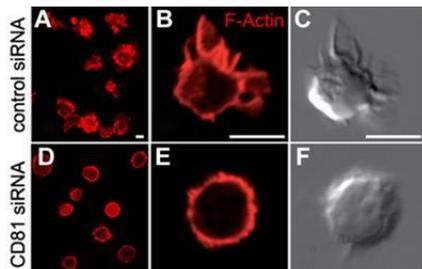
Par ailleurs, le CD81 est essentiel pour les propriétés chimiotactiques dépendant des intégrines dans les cellules dendritiques en permettant la formation de protrusions membranaires actiniques (lamellipodes) via l'activation de Rac1 (76) (**Figure 10**).



2 Figure 10 : CD81 a un rôle dans la migration des cellules dendritiques via la formation de lamellipodes médiée par Rac1

1. Test de migration en Transwell : A et C : la migration des cellules dendritiques (DC) stimulées par l'utilisation de CCL19 (ligand de CCR7), connu pour être un chimio-attractant des cellules dendritiques de moelle osseuse murines (BM) ou dérivées de lignées humaines monocytaires (Mo) est diminuée avec l'utilisation de siRNA CD81, également représentée par des diagrammes de migration obtenus par vidéomicroscopie.

2. Photos de microscopie visualisant les protrusions d'actine marquées par du Cy3phalloïdine dans les cellules BM-DC après transfection par des siRNA contrôles (A, B) et des siRNA CD81 (D, E) et en contraste de phase (C, F)



Adaptée d'après (76)

3. Infectiologie :

En infectiologie, le CD81 est un co-récepteur impliqué dans l'entrée par endocytose d'un certain nombre de pathogènes. Par exemple il constitue la voie d'entrée du virus de l'hépatite C (VHC) (77) (**Figure 11**), du VIH (78), de *Listeria monocytogenes* (79) et du *Plasmodium falciparum* (80).

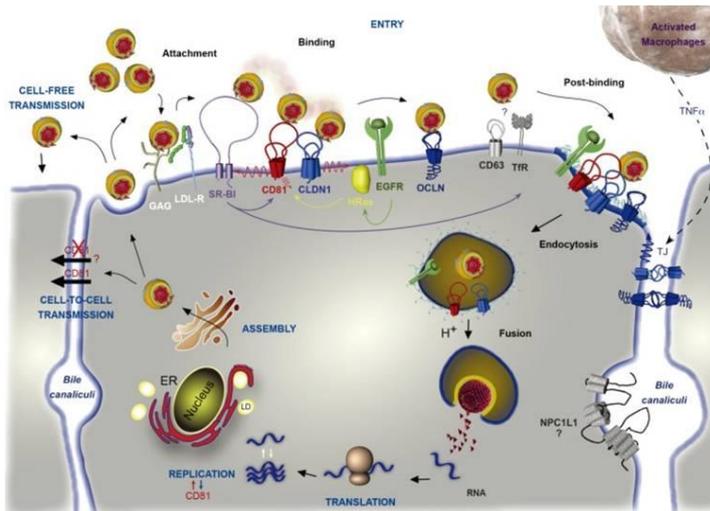


Figure 11 : Rôle de CD81 dans l'hépatite C

Après une étape d'attachement à l'hépatocyte via les glycosaminoglycans (GAG), les particules virales associées à des lipoprotéines, se lient au CD81. Le complexe virus-CD81-claudin-1 (CLDN1) est régulé par l'Epidermal Growth Factor-Receptor (EGFR) et la GTPase HRas. Le virus est ensuite internalisé par endocytose; après fusion avec un endosome, le génome viral est libéré dans le cytoplasme des hépatocytes.

D'après (81)

4. Embryologie

Le CD81 est impliqué dans le développement cérébral (33,34), de l'épithélium pigmentaire rétinien (82) et dans la fusion ovocytaire (83).

IX) Les tétraspanines (TSP) :

1. Généralités:

Le CD81 est un membre de la superfamille des TSP qui comprend 33 membres chez l'Homme et la souris. Il s'agit de molécules transmembranaires, ubiquitaires (CD81, CD82, CD9 et CD63) ou hautement restrictives (CD37, CD53) (84) (**Figure 12**).

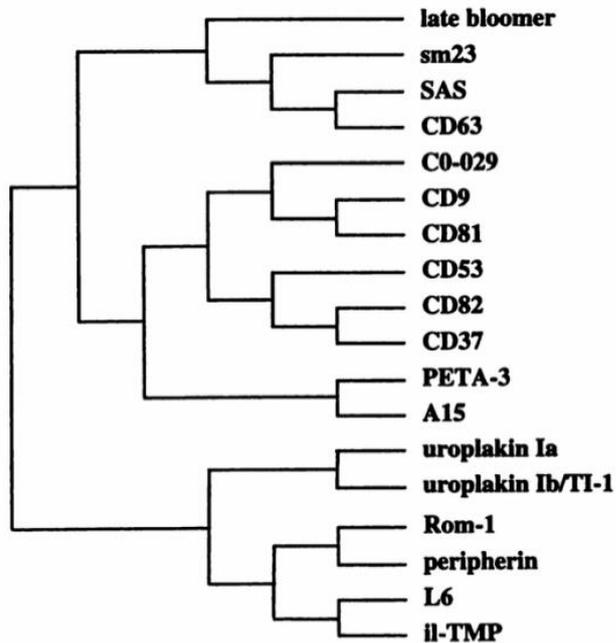


Figure 12 : Arbre phylogénétique des tétraspanines

Remarque : PETA-3 est synonyme de CD151

D'après (85)

Au niveau structurel (Figure 13), ces molécules possèdent 4 domaines transmembranaires séparant deux boucles extracellulaires (EC1 et EC2). La large boucle extracellulaire (EC2) contient une portion très variable comprenant 2 à 4 ponts disulfures permettant des interactions avec des protéines partenaires telles que des protéines appartenant à la famille des intégrines ou à d'autres molécules d'adhésion, ainsi qu'avec certaines protéines de la famille des immunoglobulines (86).

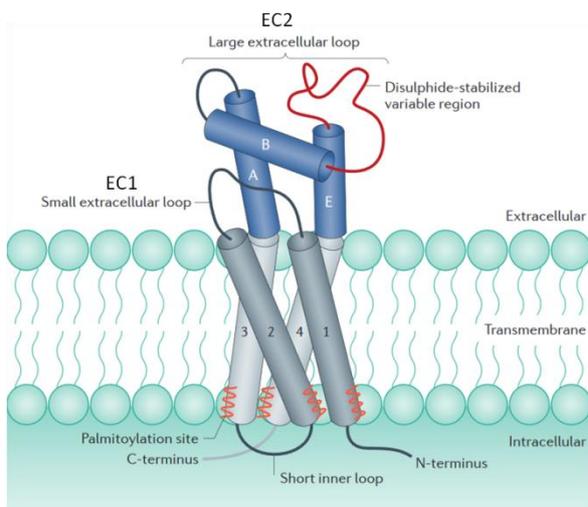


Figure 13 : Structure générale des tétraspanines.

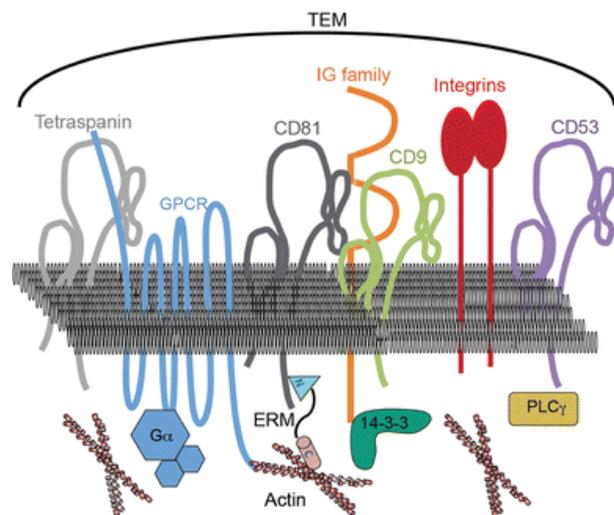
Les tétraspanines sont composées d'extrémités N et C terminales cytoplasmiques, de deux domaines extracellulaires (EC1 et EC2) et 4 domaines transmembranaires. La région variable du domaine EC2 (en rouge) permet des interactions avec des protéines partenaires et constitue également la cible d'anticorps dirigés contre les tétraspanines.

Adaptée d'après (86)

Ainsi, si les TSP sont dépourvues d'activité enzymatique intrinsèque, elles peuvent interagir avec des protéines de surface permettant la formation et la stabilisation de complexes de signalisation (« *molecular facilitators* ») (85). Elles peuvent également recruter des enzymes impliquées dans différentes voies de signalisation intracellulaires dont la protéine kinase C, impliquée dans la phosphorylation des intégrines (76). Les TSP formeraient donc à la surface cellulaire des complexes multimoléculaires rassemblés en microdomaines, pour former le « *tetraspanin-web* » ou TEM/TERMs (microdomaines enrichis en tétraspanines), véritables réseaux protéiques engagés dans des processus cellulaires essentiels et largement impliqués dans l'oncogenèse comme l'adhésion, la migration, la prolifération, la régulation de voies de signalisation, la fusion ou l'internalisation d'éléments extracellulaires (87,88) (**Figure 14**).

Figure 14 : Schéma de microdomaine enrichi en tétraspanines (TEM)

Ce schéma représente différentes tétraspanines et leurs partenaires.
D'après (70)



2. Rôles des tétraspanines dans les tumeurs solides :

Plusieurs modèles murins de xéngreffes de tumeurs solides ont permis de montrer le rôle des tétraspanines dans l'initiation et la progression tumorale (86) soit en tant que promoteur de tumeur ou en tant que suppresseur de tumeur. Ces effets dépendent de la tétraspanine en question, mais également du type de tumeur, du partenaire et/ou de la voie de signalisation impliquée.

Plusieurs exemples sont donnés dans le

Tableau II.

Tableau II : Rôle des tétraspanines dans les tumeurs solides

Tableau adapté d'après (89) et (90)

Type de cancer	Tétraspanine et corrélation avec le pronostic	Partenaire Voie de signalisation	Références
Astrocytome	CD63 ↑	TIMP-4	(91)
Cancer du sein	CD9 ↓, CD82 ↓		(92)
	CD151 ↑	Intégrine α6β4 / ERK MAPK	(93) (Figure 15)
	CD151 ↑	Intégrines α3β1, α6β1 et α6β4	(94)
	CD9 ↑	MT1-MMP / CD81 Intégrine α3β1 + PKCα	(95) (96)
Cancer rénal à cellules claires	CD151 ↑		(97)
Cancer colorectal	CD9 ↓, CD82 ↓	Intégrine α3	(98)
	CD151 ↑		
	CD63 ↓	Intégrine α3 / laminine 5	(99)
Cancer de l'endomètre	CD9 ↓	Intégrine α3	(100)
	CD151 ↑		(101)
Adénocarcinome vésical	CD9 ↓		(102)
Cancer gastrique	CD151 ↑	Intégrine α3	(103)
	CD9 ↓, CD63 ↓, CD82 ↓		(104)
Cancer pulmonaire à petites cellules	CD9 ↓	Intégrine β1	(105,106)
Mélanome	CD9 ↓		(107)
	CD63 ↓	Intégrine β1	(108)
	CD151 ↑	Intégrines α3β1, α6β1 / Ras Rac et cdc42	(109,110)
Cancer de la prostate	CD82 ↓	Intégrine β1	(111,112)
	CD151 ↑		(113)

Les mécanismes d'action des tétraspanines dans la promotion et/ou l'inhibition de l'oncogénèse sont soit une action sur la migration et/ou l'invasion cellulaire, principalement *via* les intégrines, soit une action sur l'angiogénèse tumorale (114).

Un exemple de mécanisme d'action de la tétraspanine CD151 dans le cancer du sein le mélanome est illustré par la **Figure 15**.

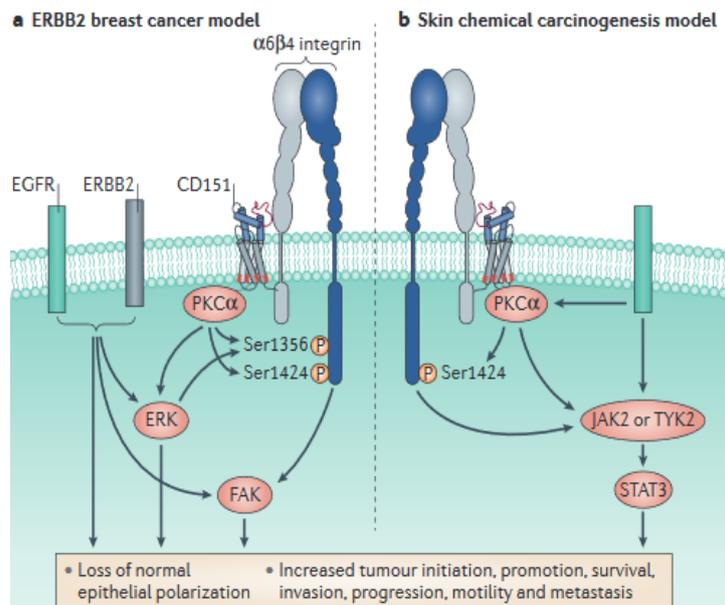


Figure 15 : Schéma représentant le mécanisme d'action de CD151 dans le cancer du sein et le mélanome

CD151 recrute la protéine kinase C (PKC α) au sein d'un complexe CD151-intégrine $\alpha6\beta4$, aboutissant à la phosphorylation de la partie β de l'intégrine dans les deux modèles d'oncogénèse.

Dans le modèle de cancer mammaire (a), PKC et ERK concourent à la phosphorylation de la $\beta4$ intégrine en un autre locus, ce qui contribue à la dépolarisation de l'intégrine. CD151 facilite également une coopération synergique entre l'intégrine $\alpha6\beta4$ et le récepteur de l'EGF (EGFR) et/ou avec ERB2 ce qui envoie un signal intracellulaire via la voie ERK ou FAK (focal adhesion kinase) dans le cancer mammaire (a) et JAK2 et STAT3 dans le modèle de cancer cutané (b)

D'après (86)

De ces mécanismes découlent diverses pistes thérapeutiques **Tableau III**.

Tableau III : Exemples de tétraspanines utilisées comme cibles thérapeutiques en oncologie

D'après (86,90,115)

Tétraspanine	Protéines associées	Rôles sur l'oncogénèse démontrés <i>in vivo</i>	Exemples de cibles développées <i>in vivo</i>	Références
CD151	Intégrines $\alpha6\beta4$, $\alpha6\beta1$ et $\alpha7\beta1$ liées aux laminines	Initiation tumorale, survie, progression, croissance, potentiel métastatique, angiogénèse	Anticorps bloquants (souris)	(116–120)
TSPAN 8	E-cadhérine, claudine 7, EPCAM, intégrine $\alpha6\beta4$	Potentiel métastatique et angiogénèse	Anti-angiogéniques (souris)	(121)
CD37	Dectin 1 Intégrine $\alpha4\beta1$	Immunité anti-tumorale, croissance cellulaire	Essais phases I/II (Homme) Otlertuzumab (TRU-016) BI 836826 (mAb 37.1) IMGN529 Betalutin	(115,122–124)
CD9	EWI2, EWIF, EPCM, claudine 1	Croissance tumorale, angiogénèse, migration	Anticorps (souris – cancer gastrique, colon)	(125,126)

3. Rôles des tétraspanines dans les hémopathies malignes :

a) Exemple du rôle de CD9 dans les leucémies aiguës lymphoblastiques :

Le CD81 et le CD9 ont une structure très poche (**Figure 12**) ; de fait, ces deux protéines partagent 45% d'homologie de séquence (127).

Le CD9 est une tétraspanine exprimée dans les cellules CD34+ et son expression est régulée par CXCL12. L'équipe de Leung *et al.* a montré que l'utilisation d'un anticorps anti-CD9 altérait la migration et l'adhésion des cellules CD34+ *in vitro* ; ceci aboutissant à une diminution des capacités de *homing* lors de xéno greffes de cellules CD34+ bloquées par l'anticorps anti-CD9 dans des souris immunodéficientes NSG (128).

De même, le CD9 est associé à la progression tumorale dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) en augmentant la prolifération cellulaire et la chimiorésistance (129,130). D'un point de vue mécanistique, l'équipe d'Arnaud *et al.* a montré que le niveau d'expression de CD9 était associé à une augmentation de l'adhésion des cellules de LAL à la fibronectine et à une augmentation de la migration médiée par CXCR4, *via* l'activation de Rac1. Cette équipe a également montré que le CD9 stimulait la formation d'extensions cytoplasmiques avec des lamellipodes riches en actine, en réponse à CXCL12 (131) (**Figure 16**).

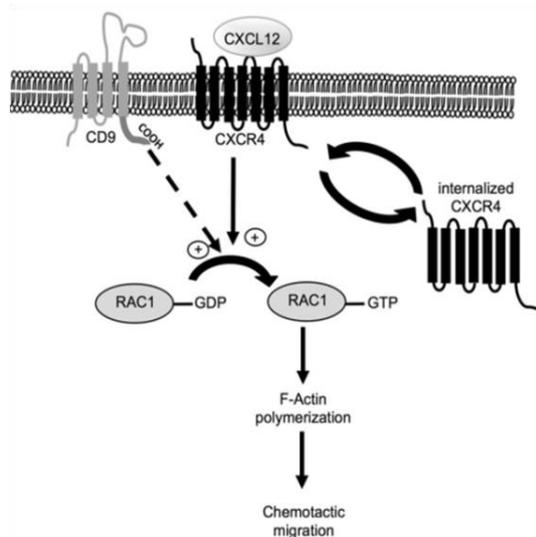


Figure 16 : Schéma modélisant le mécanisme d'action de CD9 sur la migration cellulaire via l'activation de Rac1

CD9 interagit avec CXCL12 et CXCR4 activant RAC1 qui passe d'une forme Rac-GDP inactive à une forme Rac-GTP active, ceci conduit à la polymérisation de l'actine et à la formation de protrusions cytoplasmiques qui augmente la migration cellulaire des cellules lymphoblastiques, notamment vers les sites sanctuaires, impliqués dans les rechutes de LAL.

D'après (131)

Plus récemment, l'équipe de Leung *et al.* a montré l'efficacité de l'utilisation d'un anticorps anti-CD9 en association à la chimiothérapie conventionnelle dans le traitement des LAL B de haut risque dans un modèle murin NOD/SCID.

En effet, le traitement par anti-CD9 en monothérapie injecté 7 jours après la xénogreffe de différentes lignées cellulaires de LAL B et dans des PDX (patients réfractaires ou anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic) diminuait l'envahissement tumoral et améliorait significativement la survie. L'effet était majoré lorsque l'anticorps était utilisé en association à la chimiothérapie conventionnelle. Les hypothèses mécanistiques seraient, outre une action directe sur la croissance cellulaire par inhibition de la prolifération cellulaire, une augmentation de la chimiosensibilité des blastes par induction de l'apoptose ; notamment l'association de l'anticorps anti-CD9 à la Vincristine a été montrée comme ayant un effet synergique. De plus, contrairement aux chimiothérapies conventionnelles, l'utilisation de cet anticorps ne semble pas altérer l'hématopoïèse, en faisant une intéressante piste thérapeutique dans les LAL (122).

Dans les LAM, le rôle de CD9 est plus discuté : certaines études associent sa surexpression à un impact pronostique péjoratif (133,134) alors que d'autres lui associent une corrélation avec la mutation *NPM1* et un impact favorable sur le pronostic (135,136).

b) Rôle de l'axe Musashi-tétraspanine 3 dans les leucémies aiguës myéloïdes :

La tétraspanine 3 (Tspan 3) est exprimée dans toutes les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques et son expression est régulée par Musashi2 (Msi2). L'expression de Tspan 3 est diminuée quand Msi2 est inhibée dans les cellules leucémiques et inversement.

Dans les modèles murins, l'absence d'expression à la fois de Msi2 et/ou Tspan 3 n'entraînerait pas de conséquences délétères pour l'animal. En revanche, dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de LAM, la perte de Tspan 3 impacte considérablement la leucémogénèse. En outre, l'inactivation de Tspan 3 dans un modèle de souris AML-ETO augmenterait la survie de celles-ci. L'hypothèse mécanistique de l'action de Tspan 3 dans la LAM est représentée dans la **Figure 17** (137,90).

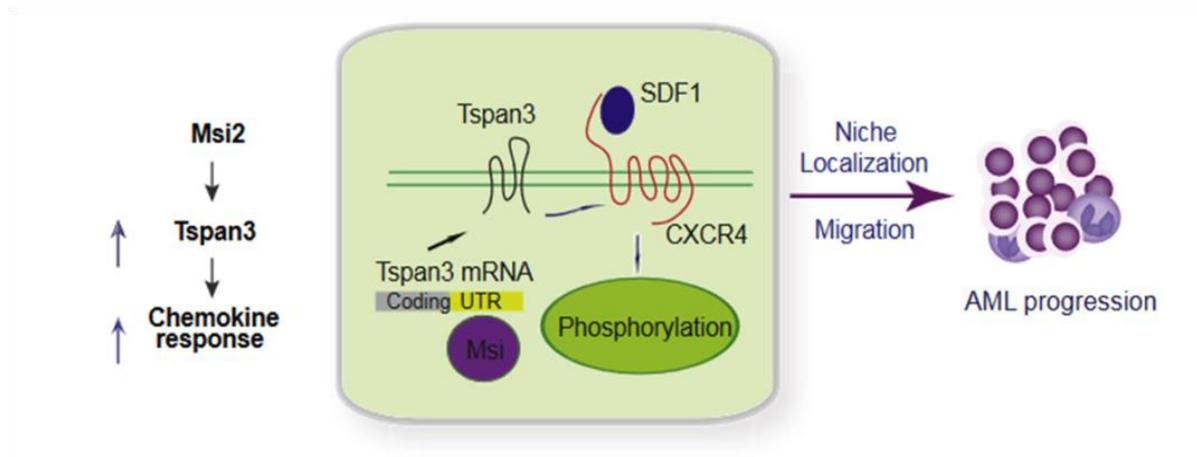


Figure 17 : Proposition de mécanisme d'action de la tétraspanine 3 (Tspan 3) dans la leucémogénèse myéloïde

Musashi 2 (Msi2) se lie à l'ARN de Tspan 3, augmentant ainsi l'expression de celle-ci. L'hyperexpression de Tspan 3 augmente l'activation de CXCR4 via le SDF-1 ; augmentant ainsi le homing et la progression des blastes.

D'après (90)

X) Rôle du CD81 en oncologie :

1. CD81 et les tumeurs solides (138) :

a) Effet promoteur de tumeur :

Plusieurs études rapportent une association entre la surexpression de CD81 et l'agressivité tumorale dans des tumeurs solides.

L'équipe d'Owens et Watt a montré dans un modèle murin de carcinome épidermoïde une association entre la surexpression de CD81 et une augmentation de la taille de la tumeur et de la progression tumorale (139). Dans un modèle de mélanome, il a été montré une association positive entre l'expression de CD81, l'invasion tumorale et le potentiel métastatique (140). Dans les carcinomes mammaires, l'expression de CD81 sur les exosomes sécrétés par les fibroblastes du stroma tumoral augmenterait la mobilité cellulaire et le potentiel métastatique (141). Dans un modèle de carcinome hépatocellulaire, la surexpression du CD81 augmenterait la prolifération des cellules tumorales *via* l'activation de la voie ERK/MAP Kinase (142).

Ces effets pro-oncogéniques ont également été démontrés *in vivo* grâce à un modèle murin de cancer mammaire et pulmonaire dans lequel des souris *CD81^{-/-}* ont développé des tumeurs moins volumineuses et moins de métastases par rapport aux souris *wild-type* (143).

b) Effet suppresseur de tumeur :

Certaines équipes associent à la protéine CD81 un rôle suppresseur de tumeur ; c'est à dire que le CD81 agirait dans certains modèles comme un régulateur négatif de la prolifération cellulaire; aboutissant à la diminution ou inhibition de croissance tumorale. Cet effet a été montré uniquement dans certains modèles de tumeurs solides. Par exemple, une faible expression de CD81 dans des lignées de carcinome hépatocellulaire a été montrée comme étant associée à un plus fort potentiel métastatique (144). De même, l'inactivation de l'expression de CD81 dans des tumeurs gastriques humaines mises en culture serait associée à une augmentation de la croissance tumorale et de la survie des cellules cancéreuses (145). Enfin, dans les cancers de vessie, un faible niveau d'expression de CD81 est associé à un moins bon pronostic (146).

2. CD81 et les hémopathies malignes :

Peu d'études ont été réalisées sur son rôle en hématologie maligne et aucune n'a été menée chez l'Homme sur son rôle potentiel dans la leucémogénèse.

La première étude du CD81 dans les hémopathies malignes date de 1990. Elle avait mis en évidence un effet anti-prolifératif de l'anticorps anti-CD81 dans des lignées de lymphomes B (68). Vingt ans plus tard, l'équipe de Luo *et al.* analyse l'expression de CD81 dans différentes hémopathies, montrant l'expression de cette protéine dans 85% des lymphomes folliculaires, 63% des lymphomes B diffus à grandes cellules, 100% des lymphomes de Burkitt, 67 % des lymphomes du manteau, seulement 17% des lymphomes de Hodgkin et 13% des myélomes multiples (147).

Dans le myélome, l'expression de CD81 est corrélée à un mauvais pronostic (148,149).

XI) Traitements par anticorps anti-CD81 :

1. Infectiologie:

Etant donné son implication dans l'infection au virus de l'hépatite C (VHC), des anticorps monoclonaux anti-CD81 ont d'abord été testés en infectiologie. *In vitro*, l'utilisation d'anticorps anti-CD81 inhibe de façon efficace l'infection par le VHC et sa dissémination sans effet cytotoxique sur les lignées cellulaires testées (150).

Chez la souris, l'utilisation d'anticorps anti-CD81 humain K04 et JS81 empêche l'entrée du virus VHC dans les hépatocytes et prévient ainsi d'une infection active au VHC lorsqu'il est administré dans les six heures post exposition (151).

Utilisé chez les singes cynomolgus, l'anticorps monoclonal anti-CD81 K21 n'a pas montré de toxicité (152), y compris à fortes doses.

2. Hématologie:

Dans un modèle de souris transgéniques déficientes en CD81 murin mais exprimant la protéine CD81 humaine (153), une étude préliminaire avait testé l'utilisation de l'anticorps anti-CD81 humain clone 5A6, MslgG1. Cette étude avait montré un profil de sécurité acceptable de cet anticorps chez la souris.

L'équipe de Vences-Catalan *et al.* (154) explore les mécanismes d'action, l'efficacité et la sûreté d'une immunothérapie anti-CD81 comme alternative au traitement par Rituximab. Dans cette étude, le traitement par 4 doses hebdomadaires de l'anticorps 5A6, 5 jours après la xénogreffe d'une lignée cellulaire de lymphome B (Raji), a montré son efficacité pour réduire la progression tumorale et augmenter la survie dans un modèle de souris SCID.

L'efficacité de l'anticorps était comparée à un groupe contrôle traité par le contrôle isotypique et un groupe traité par l'anticorps anti-CD20 Rituximab (*Figure 18*).

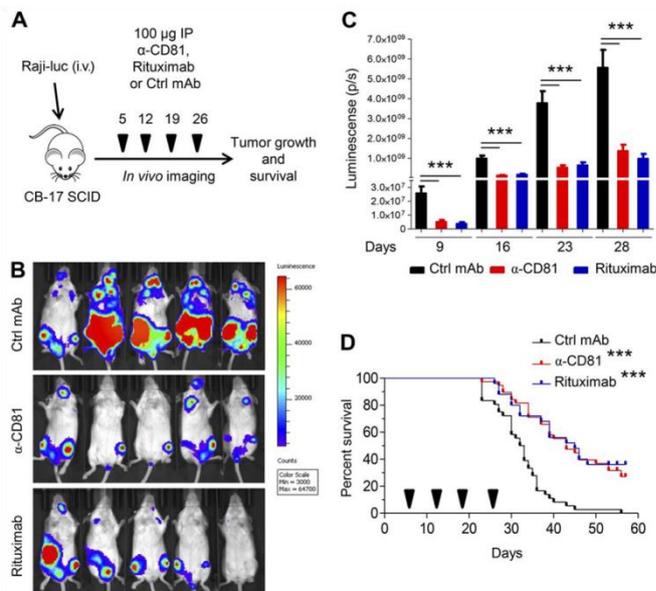


Figure 18 : L'immunothérapie anti-CD81 par l'anticorps 5A6 diminue la progression tumorale et augmente la survie dans un modèle murin de lymphome B.

A. Schéma de traitement par 100 µg d'anticorps anti-CD81 (ou isotype ou Rituximab) à J5, 12, 19 et 26 après xénogreffe

B. Envahissement tumoral visualisé en bioluminescence à J23 de la xénogreffe

C. Quantification du signal de bioluminescence selon le groupe de traitement et le délai post-xénogreffe

D. Courbe de survie en fonction du groupe de traitement, les flèches représentent les jours d'injection de traitement

D'après (154)

Le mécanisme d'action in vitro de cet anticorps a été étudié par les auteurs : l'anticorps 5A6 (contrairement au Rituximab) induit un effet cytotoxique direct en activant la caspase 3 et la poly(ADP ribose) polymérase (PARP). Cet effet n'est pas retrouvé avec les autres anticorps anti-CD81 testés (1D6; JS81 ou 1.3.3.22), probablement en raison du site de liaison de l'épitope de l'anticorps 5A6 qui est différent des autres anti-CD81.

Cependant, l'efficacité de l'anticorps ne peut pas être liée à son seul effet cytotoxique car seulement 20% des cellules sont éliminées in vitro. En présence de cellules NK, la cytotoxicité induite par l'anticorps 5A6 augmente et équivaut à celle induite par le Rituximab; indiquant un mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

In vivo, dans des modèles de souris déplétés en macrophages ou cellules NK, l'efficacité de l'anticorps était sensiblement réduite suggérant que le mécanisme d'action de cet anticorps est dépendant de l'ADCC et de l'ADCP. En revanche; la déplétion en complément n'a aucun effet sur l'action de l'anticorps.

Afin de comparer les effets du Rituximab et de l'anticorps 5A6, les auteurs ont généré un anticorps chimérique 5A6 avec HulgG1, ce nouvel anticorps a démontré une

cytotoxicité dépendant de la voie du complément (CDC) et de la phagocytose (ADCP) importante. Il n'est donc pas possible d'exclure une potentielle action du complément dans la perspective d'un traitement par l'anticorps anti-CD81 chez l'homme.

Bien qu'exprimé dans de nombreux tissus physiologiques, le CD81 n'est pas exprimé sur les globules rouges, les cellules de la lignée granuleuse et les plaquettes ; l'utilisation de celui-ci n'a donc aucune conséquence sur ces lignées hématopoïétiques. De plus, dans l'étude de Vences-Catalan *et al.* récemment publiée, l'anticorps anti-CD81 clone 5A6 a une action cytotoxique préférentielle sur les cellules lymphomateuses par rapport aux lymphocytes normaux, contrairement au Rituximab qui agit indifféremment sur les cellules tumorales et les lymphocytes B. Ceci serait dû à la divergence d'expression différentielle de CD81 entre les cellules lymphomateuses qui l'expriment très fortement contrairement aux lymphocytes B qui l'expriment plus faiblement (154).

XII) Rôle des tétraspanines et du CD81 dans la sécrétion des exosomes :

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires (30 à 150 nm de diamètre) issues des corps multivésiculaires et sécrétées par la fusion de ces derniers avec la membrane plasmique (***Figure 19***). Ils ont un rôle clé dans la communication intercellulaire dans de nombreux tissus (155).

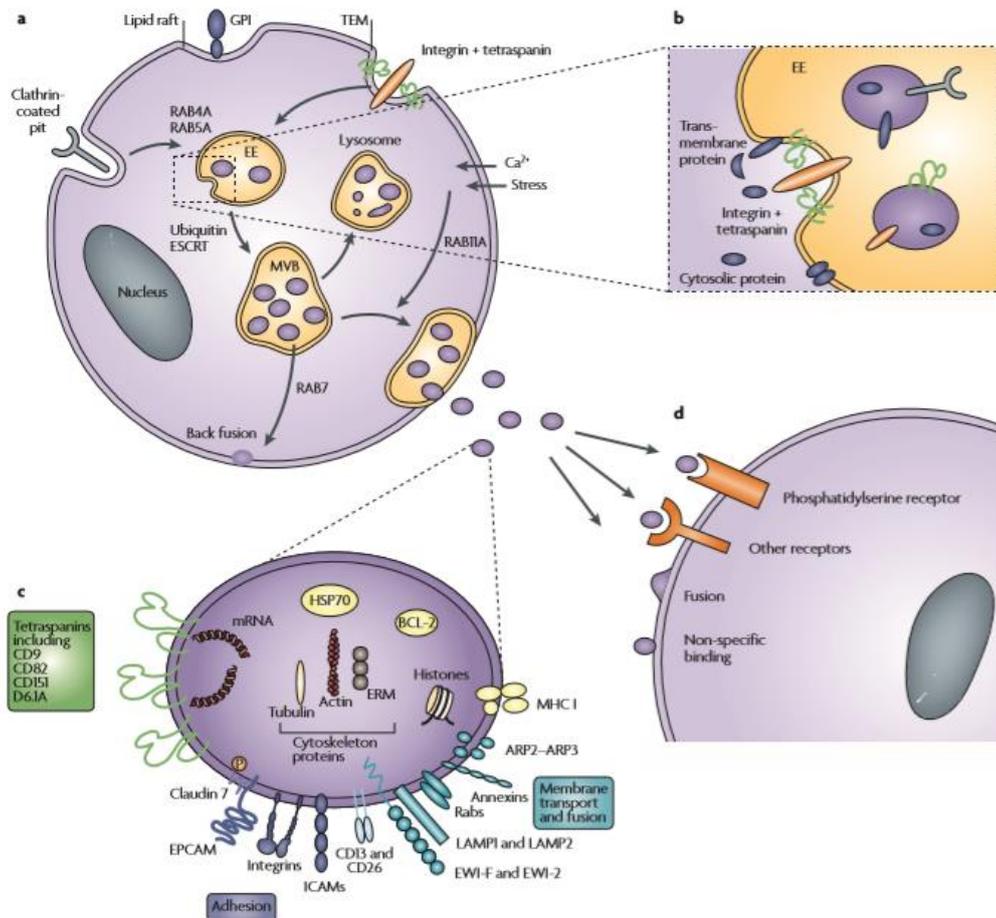


Figure 19 : La genèse des exosomes.

a,b : Sous l'action de signaux provenant de protéines transmembranaires (tels que les tétraspanines-enriched membrane microdomains (TEMs)) ; les corps multivésiculaires (MVB) provenant des invaginations membranaires des endosomes précoces sécrètent des vésicules intraluminales, qui sont transportées par les ESCRT ; une partie de ces vésicules est dégradée via les lysosomes, tandis que d'autres sont sécrétées dans le milieu extracellulaire par la fusion des MVB avec la membrane plasmique. Ces vésicules extracellulaires sont alors appelées exosomes.

c : La composition des exosomes varie selon leur cellule d'origine ; certains composant sont communs, telles que les protéines de membranes liées aux tétraspanines, les intégrines, la molécule d'adhésion aux épithéliums (EPCAM), claudin7, CD13, EWI-2. Les différentes voies de signalisation downstream sont des molécules liées aux tétraspanines tels que les GTP-binding protéines, les protéines Src, ERK 1 et 2, les protéines de la famille Rho et les caténines.

D'après (156)

En oncologie, plusieurs études ont montré le rôle des exosomes dans l'invasion tumorale et l'augmentation du potentiel métastatique. Les mécanismes impliqués pourraient être un échappement à l'apoptose ou à la surveillance immunologique et une acquisition d'un phénotype de chimiorésistance (157–159,141).

L'action activatrice ou suppressive de tumeur des tétraspanines pourrait donc être liée à leur implication dans la biogénèse des exosomes.

Deux études rapportent que les patients atteints d'hémopathies malignes ont une sécrétion accrue d'exosomes dans leur plasma par rapport à des sujets sains (160,161). L'étude de Szczepanski *et al.* (161) s'intéresse uniquement aux LAM et montre que les sérums de patients atteints de LAM contiennent plus d'exosomes. Dans cette étude, la co-culture de cellules NK avec des isolats de microvésicules issus de plasmas de patients atteints de LAM induit une diminution de la cytotoxicité des cellules NK; ce qui n'est pas le cas avec les isolats de microvésicules issus de sujets sains. Ainsi, par une augmentation de la production d'exosomes, les blastes myéloïdes pourraient avoir une action sur l'immunité anti-tumorale.

Il est admis que la composition des exosomes est variable et dépend du type cellulaire qui les sécrète. En étudiant leur composition, plusieurs équipes se sont aperçues que les exosomes pouvaient avoir un rôle direct dans la leucémogénèse. Par exemple, l'équipe de Huan *et al.* a montré la présence, au sein de ces exosomes, d'ARN jouant un rôle dans la pathogénèse de la LAM, avec notamment la présence de transcrits tel que *NPM1*, *FLT3-ITD*, *CXCR4*, *MMP9* et *IGF-IR* (162).

Les exosomes sont en outre caractérisés par une prépondérance d'ARN non codants de type micro-ARN dont les rôles multiples dans la physiopathologie de la LAM et la résistance aux traitements commencent à être décrits (162–165).

Ces exosomes auraient également un impact direct sur le micro-environnement tumoral. Par exemple, il a été montré que les exosomes dérivés de cellules de leucémie myéloïde chronique (LMC) pouvaient stimuler les cellules stromales de la moelle osseuse en augmentant leur production d'IL-8, augmentant ainsi l'envahissement leucémique (166).

Les blastes de LAM utiliseraient les exosomes pour interagir avec leur micro-environnement. En effet, *via* le transfert de protéines, lipides et ARN, les exosomes pourraient avoir un rôle dans le remodelage de la niche hématopoïétique, garantissant la survie (38,166,167) des cellules leucémiques par divers mécanismes, résumés dans la **Figure 20** :

1/ Altération des fonctions immunitaires : Hong *et al.* ont observé que les exosomes isolés chez des patients atteints de LAM comportaient, au diagnostic, un taux en protéines, notamment en TGF- β 1, significativement plus élevé que les exosomes issus de témoins sains. Ils ont montré que ces vésicules contenaient des pro-peptides associés au TGF- β 1 et diverses protéines (PD-1, PD-L1, COX-2, FasL, ou CD39/CD73) pouvant altérer les fonctions des cellules immunitaires (168).

2/ Modification du stroma médullaire : L'équipe de Huan *et al.* a également montré dans deux modèles cellulaires de LAM, à la fois *in vitro* et *in vivo*, que les exosomes dérégulaient la production de chimiokines par les cellules stromales, aboutissant à une disparition des CSH de la moelle osseuse faisant place aux blastes leucémiques (169).

L'équipe de Kumar *et al.* a également montré que l'exposition de cellules stromales de moelle osseuse à des exosomes issus de blastes myéloïdes conduisait à une augmentation de l'expression de gènes promoteurs de tumeur (DKK1, IL-6, CCL3) et à une diminution de l'expression des gènes régulant l'hématopoïèse (CXCL12, KITL, IL-7, IGF1) et l'ostéogénèse (OCN, Col1A1, IGF1) (170).

3/ Action sur les cellules mésenchymateuses : L'équipe de Kumar *et al.* a récemment démontré que les exosomes issus de blastes de LAM pouvaient altérer la différenciation des progéniteurs mésenchymateux conduisant à une diminution du développement des ostéoblastes.

Une autre équipe a relaté que les exosomes issus des blastes de LAM entraînaient une diminution de sécrétion des facteurs de croissance

hématopoïétiques par les cellules mésenchymateuses *via* l'expression du micro-ARN-7977 (171).

4/ Action sur les cellules endothéliales avec augmentation de l'angiogénèse : par l'expression notamment des micro-ARN, les exosomes issus des blastes peuvent induire la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), augmentant ainsi l'angiogénèse dans la niche (172,173).

Tous ces mécanismes initiés *via* les exosomes concourent à rendre le micro-environnement plus favorable à la survie et à la prolifération des cellules leucémiques.

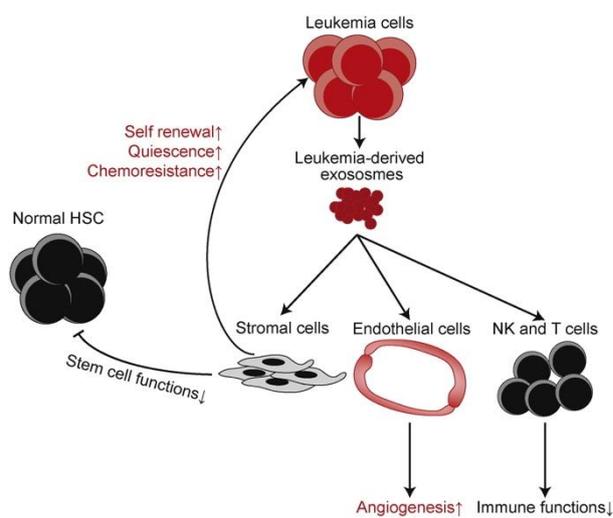


Figure 20 : Schéma représentant une hypothèse de remodelage du microenvironnement par les exosomes dérivés des blastes de LAM.

Les exosomes dérivés de cellules leucémiques transportent des ARNm, micro-ARN et protéines vers les cellules stromales, endothéliales et immunitaires conduisant à l'augmentation de l'angiogénèse ; l'immunosuppression et la transformation des cellules stromales. Les cellules stromales modifiées altèrent les capacités des CSH (HSC) et envoient des signaux pour promouvoir l'auto-renouvellement, la quiescence et la chimiorésistance des CSL (LSC).

D'après (38)

Le CD81 est exprimé à la surface des exosomes (156,174) et plusieurs études, notamment dans les LAM rapportent une association pronostique négative entre la quantité d'exosomes sécrétés et le pronostic (168,175).

Il m'a donc semblé intéressant d'étudier le lien entre l'expression phénotypique de CD81 à la surface des blastes de patients atteints de LAM et la quantité d'exosomes sécrétés dans le plasma.

XIII) Impact pronostique de l'expression du CD81 dans les LAM
de l'adulte de novo – travaux préliminaires :

Depuis 2013, l'équipe effectue une analyse phénotypique de tous les prélèvements de patients ayant eu un diagnostic de LAM au Centre Hospitalier Universitaire de Lille avec l'étude des marqueurs CD34, CD38, CD90, CD123 et CD81, dans le but d'affiner le phénotype des CSL.

Les analyses phénotypiques des 134 échantillons de patients atteints de LAM *de novo* montraient une corrélation entre un faible niveau d'expression du CD81 et un caryotype lié à un pronostic favorable (**Tableau IV**). Ces premiers résultats nous ont été confirmés par analyse transcriptomique sur une seconde cohorte.

Tableau IV : Caractéristiques des patients et association en analyse univariée entre l'expression de CD81 et plusieurs facteurs pronostiques
D'après (176)

	All patients (n=134)	< 20% CD81 ⁻ Blasts (n=42)	> 20% CD81 ⁺ Blasts (n=92)	P-value
Gender [M/F]	79/56	24/18	54/38	0.83
Age [years] [§]	51.1±16.0	46.9±16.4	53.0±15.5	0.04
WBC [G/L]*	28 (1-325)	14 (2-198)	45(1-325)	0.02
FAB type				<0.0001
M0	3% (4/101)	3% (1/35)	4% (3/66)	
M1	22% (22/101)	14% (5/35)	26% (17/66)	
M2	28% (28/101)	49% (17/35)	17% (11/66)	
M4	26% (26/101)	31% (11/35)	23% (15/66)	
M5	19% (19/101)	3% (1/35)	27% (18/66)	
M6	2% (2/101)	0% (0/35)	3% (2/66)	
Hemoglobin level [g/dL] [§]	9.5±2.2	9.5±2.3	9.4±2.1	0.81
Platelet count [G/L]*	59 (7-864)	70 (12-864)	58 (7-670)	0.96
Cytogenetic risk, (n/N)				<0.0001
Favorable	11% (14/131)	28% (12/42)	2% (2/89)	
Intermediate	75% (98/131)	55% (23/42)	84% (75/89)	
Unfavorable	14% (19/131)	17% (7/42)	14% (12/89)	
<i>FLT3-ITD</i> , (n/N)	28% (36/129)	17% (7/41)	33% (29/88)	0.06
<i>NPM1 mut</i> , (n/N)	34% (43/125)	28% (10/36)	37% (33/89)	0.32

*median with range in parenthesis; [§]mean ± SD: standard deviation; WBC: white blood cell count; M: male; F: female; NA: not applicable.

En analyse multivariée, après ajustement sur les facteurs pronostiques connus (âge au diagnostic, classification cytogénétique et statut mutationnel de *NPM1 +/- FLT3-ITD*), l'expression de CD81 apparaît être un facteur pronostique indépendant sur la survie sans événement (EFS), la survie globale (OS) et la survie sans rechute (RFS) ($p=0.003$, 0.002 and 0.0001 respectivement) (**Tableau V**) (*Figure 21*) (176).

Tableau V : Association entre l'expression de CD81 et la survie en analyse multivariée

Association exprimée en Hazard Ratio (HR) en analyse multivariée après ajustement sur l'âge au diagnostic, le risque cytogénétique (classification ELN) et le statut *NPM1 +/- FLT3-ITD* de l'expression de CD81 avec la survie sans événement (EFS), la survie globale (OS) et la survie sans rechute (RFS).

D'après (176)

EFS : Event Free Survival ; OS : Overall Survival ; RFS : Relapse Free Survival

	HR (95% CI)	P-value
EFS	3.45 (1.5-7.8)	0.003
OS	4.14 (1.69-10.14)	0.002
RFS	9.46 (2.66-33.71)	0.0005

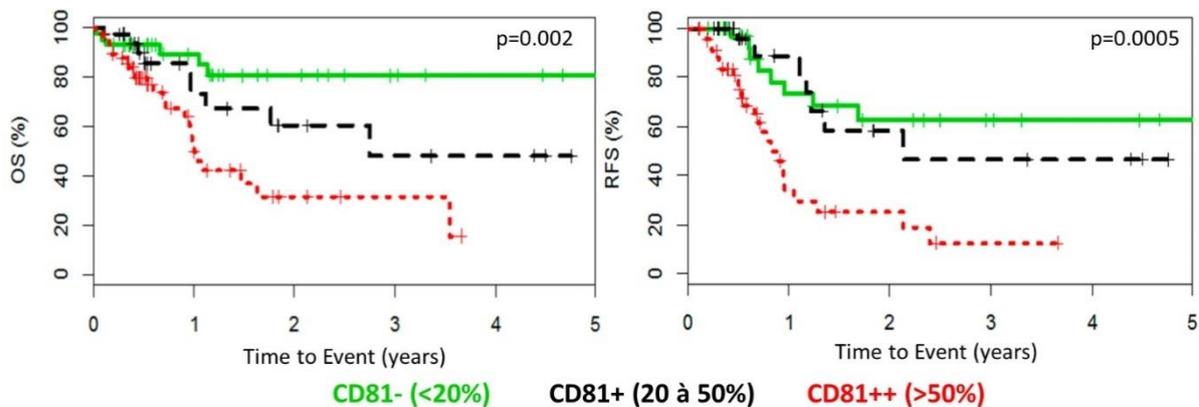


Figure 21 : Courbes de survie stratifiées sur l'expression médullaire du CD81 au diagnostic pour (A) la survie globale (OS), (B) la survie sans rechute (RFS) sur la cohorte de 134 patients atteints de LAM

D'après (176)

Le CD81 a notamment un impact défavorable sur le pronostic (OS) des patients ayant des critères cytogénétiques de risque favorable tels que la présence d'une mutation *NPM1* ($p=0.01$) ou un caryotype associé à un pronostic favorable ($p=0.002$).

La deuxième partie de mon travail a donc été consacré à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'impact pronostique péjoratif du CD81 dans les LAM.

Objectifs

En résumé, l'étude des CSL est primordiale, d'une part pour la compréhension des mécanismes de leucémogénèse et de résistance aux traitements mais également car celles-ci pourraient constituer des cibles thérapeutiques intéressantes.

Deux protéines ont attiré notre attention comme pouvant avoir un rôle pronostique dans la LAM, éventuellement en étant des marqueurs de cellules souches leucémiques.

ABCB1, membre de la famille des transporteurs *ATP Binding Cassette*, est exprimée à la surface des blastes myéloïdes chez environ la moitié des patients atteints de LAM. Cette protéine est connue pour son implication dans la chimiorésistance, notamment aux anthracyclines, pivot du traitement des LAM. Cependant, les mécanismes d'action sont encore mal compris. Il existe certains médicaments capables de réverser les effets d'ABCB1 mais les résultats publiés sont contradictoires. Egalement, une corrélation a été retrouvée entre une expression forte d'ABCB1, un faible niveau d'expression de CD33 et la réponse au traitement par gemtuzumab ozogamicin. Ainsi, la détermination du profil d'ABCB1 pourrait aider à la prise en charge des patients, à la fois pour la stratification thérapeutique et le choix du traitement.

CD81, membre de la famille des tétraspanines, est associée à un mauvais pronostic lorsqu'elle est surexprimée à la surface des blastes de patients atteints de LAM. De nombreux travaux ont montré un rôle des tétraspanines dans la cancérogénèse, notamment un rôle facilitateur de tumeur par divers mécanismes dont l'augmentation de l'adhésion et de la migration. Le CD81 semble impliqué dans la progression des cellules lymphomateuses B et des essais thérapeutiques portant sur le rôle d'un anticorps spécifique sont en cours, avec des résultats préliminaires encourageants. Cependant, aucune étude n'a à ce jour été publiée sur le rôle de cette protéine dans la leucémogénèse des LAM.

Dans la première partie de ma thèse, nous avons étudié le rôle d'ABCB1 dans la leucémie aiguë myéloïde, tout d'abord en déterminant sa corrélation avec les données cytologiques, cytogénétiques et moléculaires, l'expression génique mais aussi le profil de chimiosensibilité des blastes de patients atteints de LAM de novo. Nous avons également étudié la survie chez des patients avec un fort niveau d'expression d'ABCB1 traités par la Quinine en association à une chimiothérapie conventionnelle. Enfin nous avons essayé de comprendre le rôle d'ABCB1 chez les patients traités par chimiothérapie + Gemtuzumab ozogamicin.

Ces résultats ont fait l'objet de la publication suivante, disponible en Annexe I:

Boyer T, Gonzales F, Barthélémy A, Marceau-Renaut A, Peyrouze P, Guihard S, et al. Clinical Significance of ABCB1 in Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Study. *Cancers (Basel)*. 6 sept 2019;11(9) (177).

Dans une seconde partie, au vu des résultats de l'équipe sur le rôle pronostique indépendant de CD81 dans les leucémies aiguës myéloïdes (176), nous avons cherché par quels mécanismes la protéine CD81 présente à la surface des blastes de patients atteints de LAM pouvait grever de façon significative le pronostic de ces patients.

En effet, dès les premiers résultats, nous envisagions que cette protéine pourrait devenir une cible thérapeutique potentielle ; ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués s'avérait être une étape préliminaire essentielle avant d'envisager une telle thérapie ciblée.

La littérature actuelle sur le rôle des tétraspanines dans l'oncogénèse et notamment de CD9 et CD81 m'a poussée à étudier les mécanismes de prolifération, adhésion, migration et invasion cellulaires. Le concept de cellules souches leucémiques, qui, au départ, nous avait fait nous intéresser à cette protéine, m'a conduit à étudier les phénomènes de *homing* et la chimiorésistance en fonction de l'expression de CD81. Également, le CD81 est connu pour être un marqueur d'exosomes, je me suis donc intéressée au lien entre CD81 et sécrétion d'exosomes.

Les premiers résultats de ce travail font l'objet d'une publication en cours de rédaction.

Gonzales F, Peyrouze P, Boyer T, Guihard S, Barthelemy A, Berthon C, Preudhomme C, Roumier C and Cheok M.

Targeting aberrant expression of CD81 impacts cell adhesion and migration and prognosis of adult acute myeloid leukemia.

Matériels et méthodes

l) Obtention des modèles cellulaires ayant une expression différentielle du CD81 :

1. Lignées cellulaires :

Les lignées cellulaires utilisées sont des lignées de LAM humaines disponibles dans l'équipe. Les cellules sont cultivées en milieu RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, GlutaMAX[®] Supplement ; Gibco[®] by Life Technologies[®]) ; IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, ATCC[®]) ou DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco[®] by Life Technologies[®]) avec 1% de pénicilline-streptomycine (Gibco[®]) et 10% ou 20% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco[®] by Life Technologies[®]), dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide et enrichie en CO₂ (5%).

Une lignée de fibroblastes dérivés du stroma médullaire (HS-5) a été utilisée pour la réalisation de tests en co-culture. Les milieux de culture utilisés pour chaque lignée cellulaire sont représentés dans le **Tableau VI**.

Tableau VI : Milieux de culture utilisés en fonction des lignées cellulaires

Lignée cellulaire	Milieu de culture	Sérum de veau fœtal		
HL-60	RPMI 90%	SVF 10%		
MV4-11				
U-937				
Nomo-1				
SKNO1	RPMI 90%	SVF 10% + 10ng/mL GM-CSF		
Kasumi	RPMI 80%	SVF 20 %		
HNT-34				
OCI-AML3				
Molm13				
ME-1	IMDM 90%	SVF 10%		
K562				
KG1			IMDM 80%	SVF 20 %
HS-5			DMEM 90%	SVF 10%

2. Transduction des cellules pour permettre un suivi en bioluminescence :

Les lignées cellulaires de LAM ont ensuite été transduites par un vecteur lentiviral codant pour l'expression de la luciférase (plasmide pLenti PGK V5-LUC Neo (623-2), ref. 21471 ; Addgene®) de façon à pouvoir identifier ces cellules en co-culture lors de tests *in vitro* et aussi de les suivre, lors d'études *in vivo*. Les cellules obtenues ont été sélectionnées avec 0,5mg/ml d'antibiotique G418 (InvivoGen®).

3. Obtention d'un modèle stable de surexpression du CD81 par transfections :

La lignée cellulaire ayant une expression nulle du CD81 a été transfectée avec le plasmide pCDM8 hCD81 (ref. 11588 ; Addgene®) (Figure 22) afin d'induire son expression ectopique.

Les transfections ont été réalisées par électroporation selon le protocole Cell line Nucleofector® (Amxa Nucleofector®, Lonza®). 5 millions de cellules sont mises en suspension avec 5µg de plasmide d'intérêt dans une solution conductrice (kit C) selon le protocole du fabricant. L'application d'un champ électrique (programme W-001) entraîne la création temporaire de pores dans la bicouche lipidique permettant ainsi l'introduction de l'ADN dans les cellules.

Une semaine après la transfection, les cellules ont été triées en cytométrie en flux (FACS ARIA III TRIEUR BD Biosciences®, Franklin Lakes, NJ, USA) sur l'expression membranaire du CD81 afin d'obtenir des lignées cellulaires stables CD81⁻ et CD81⁺. Deux tris successifs à une semaine d'intervalle ont été nécessaires pour l'obtention de lignées stables.

dans 300µL de PBS-0.4% BSA avant d'être passés au cytomètre (LSR FORTRESSA X20 ; BD Biosciences®). Les données de cytométrie en flux sont analysées grâce au logiciel FlowJo (Tree Star®).

Les analyses ont été effectuées au moins trois fois pour chaque lignée puis de façon répétée à la décongélation de nouveaux culots cellulaires.

Tableau VIII : Récapitulatif des différents anticorps utilisés pour les marquages en cytométrie en flux avec les quantités utilisées

Nom	Antigène	Isotype	Fluorochrome	Quantités d'anticorps	Fournisseur	Références
Anti-hCD45	CD45 humain	Mouse IgG1	FITC	0,12µg	Biolegend®	BLE304006
Anti-mCD45	CD45 murin	Rat IgG2bK	APC	0,2µg	Biolegend®	BLE103112
Anti-CD81	CD81 humain	Mouse IgG1K	PE	0,5µg	Biolegend®	BLE349506

2. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) :

L'ARN total des cellules est extrait grâce au kit Nucleospin RNA Isolation (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany). Ensuite, 1µg d'ARN est rétro-transcrit en ADNc à l'aide du kit Superscript® VILO cDNA synthesis kit (ThermoFisher Scientific Inc.®) selon les instructions du fabricant. L'ADNc obtenu est ensuite utilisé pour la RT-PCR avec le kit Taqman Universal Master Mix et la sonde du gène d'intérêt ; ici : CD81 Hs00174717_m1 (ThermoFisher Scientific Inc.®), sur l'appareil StepOne Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific Inc.®). Le gène de référence utilisé pour normaliser est la glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase grâce à la sonde GAPDH, Hs03929097_g1 (ThermoFisher Scientific Inc.®).

3. Western blot :

5 millions de cellules sont lysées dans une solution de *Cell Lysis Buffer* (Cell Signaling®) additionnée d'inhibiteurs de protéases (Roche®) et auxquels sont ajoutés extemporanément des inhibiteurs de phosphatases (SantaCruz Biotechnology®). Après incubation 30 minutes sur glace, les lysats sont centrifugés à 14000g pendant 30 minutes à 4°C. Le dosage des protéines est effectué grâce au kit *Pierce® BCA Protein Assay* (Thermo Scientific®). 30µg de lysats protéiques sont déposés, sans dénaturation thermique préalable, sur gel SDS-PAGE 4-12% (NuPAGE® 4-12% Bis Tris Gel 1.0mm, Life Technologies®) et séparés à 200 Volts dans du tampon de

migration NuPAGE® (SDS Running Buffer NuPAGE MES, Life Technologies®). Le transfert est ensuite réalisé en phase solide grâce au système iBlot® Gel Transfer Device (Life Technologies®). Après saturation des sites aspécifiques dans une solution de TBS (Santa Cruz Biotechnology®), Tween 0.2% (Millipore®) avec 5% de lait, les membranes sont incubées une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps anti-CD81 (clone JS-81, réf 555675, BD Biosciences®) dilué au 1/500^{ème} dans une solution de TBS-Tween 0.2% contenant 5% de lait. Après 3 lavages dans une solution de TBS-Tween 1%, les membranes sont incubées avec un anticorps secondaire *anti-mouse* couplé à la peroxydase (dilution 1/5000^{ème}) (Cell Signaling Technology®). Les immunoempreintes sont révélées par chemiluminescence avec un LAS 4000 (Fujifilm®) par utilisation du kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Life Sciences®). L'homogénéité des dépôts entre chaque puits est vérifiée grâce à l'actine ou la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). La quantification des immunoempreintes est réalisée grâce au logiciel ImageQuant® LAS 4000 Control Software (GE Life Sciences®).

III) Utilisation d'anticorps bloquants anti-CD81 :

Pour chaque expérience de blocage, deux anticorps monoclonaux de marques différentes et ciblant des épitopes distincts sont utilisés ainsi qu'un anticorps contrôle isotypique :

- Anticorps anti-CD81, clone 1.3.3.22 (Santa Cruz®) (SC)
- Anticorps anti-CD81, clone JS-81 (BD biosciences®) (BD)
- L'isotype utilisé est une IgG1 κ (Santa Cruz®).

Les cellules sontensemencées à la concentration de 10x10⁶/mL dans du milieu contenant 1 μ g d'anticorps par million de cellules.

Pour les xénogreffes et les tests de chimiosensibilité, le temps de blocage est de 4 heures.

Dans la suite de l'exposé, je parlerai de l'anticorps SC en référence à l'anticorps anti-CD81 clone 1.3.3.22 (Santa Cruz®) et de l'anticorps BD en référence à l'anticorps anti-CD81 clone JS-81 (BD Biosciences®).

IV) Etude de la chimiosensibilité par test de viabilité MTS :

Ce test est basé sur la transformation du 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium (MTS) en formazan, molécule soluble, par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase, présente dans les cellules métaboliquement actives permettant d'évaluer la survie cellulaire. La quantité de formazan produite est détectée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 490nm, directement proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives.

Dans l'équipe, ce test est pratiqué pour comparer la cytotoxicité des chimiothérapies utilisées en pratique clinique dans le traitement de la LAM, constituant ainsi un test de chimiosensibilité.

Trois drogues sont testées à des concentrations différentes : daunorubicine (DNR), clofarabine (clo) et aracytine (ara). Ces tests sont faits sur les cellules exprimant différemment le marqueur CD81 afin de rechercher une association entre l'expression du CD81 et une éventuelle chimiorésistance.

Les cellules sontensemencées à la concentration de 0,5 millions de cellules/mL en plaques 96 puits contenant 8 concentrations croissantes différentes, obtenues par dilutions en série pour chaque molécule et cultivées pendant 72 h. Puis, 20µl de la solution de MTS (CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Assay, Promega[®]) sont ajoutés dans chaque puits. Après 3h d'incubation à 37°C (en atmosphère humide + CO₂), l'absorbance est mesurée à 490 nm par le lecteur de plaque Spectramax I3 (Molecular Devices[®]) et le logiciel SoftMax[®] Pro Software (Molecular Devices[®]).

La corrélation entre la concentration de drogue et la viabilité cellulaire nous permet de déterminer la concentration pour laquelle 50% des cellules sont vivantes (IC₅₀) pour chaque drogue testée. Les IC₅₀ sont rapportés en pourcentage de la condition contrôle (isotype pour les anticorps bloquants, lignées contrôles pour les cellules surexprimant ou sous-exprimant le CD81).

V) Etude de la prolifération cellulaire :

1. Comptage par cytométrie en flux :

Les cellules sontensemencées en milieu de culture dans des plaques 6 puits à 0,5 millions de cellules/mL. Toutes les 24 heures, les cellules sont comptées par cytométrie en flux (Cell Lab Quanta MPL Analyseur Beckman Coulter®) puis diluées avec du milieu de culture de sorte qu'elles restent à une concentration de croissance optimale. Les coefficients de dilution sont appliqués aux valeurs de concentration obtenues.

2. Tests de clonogénicité :

Les cellules sontensemencées à une concentration de 50 cellules/mL dans de la méthylcellulose enrichie avec des cytokines et de l'EPO pour cellules humaines (réf 4034, Stemcell®). Après 13 jours de culture à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂, les colonies sont comptées au microscope.

VI) Etude de l'adhésion cellulaire :

1. Adhésion à la fibronectine :

Les plaques 96 puits sont préalablement coatées avec 1 µg de fibronectine (Fibronectin from human plasma, Sigma®) diluée dans 50µl de PBS par puits, laissées sécher au moins 45 minutes à température ambiante puis stockées à 4°C avant utilisation.

1 × 10⁶ de cellules (ou 0.5 × 10⁶ cellules pour la lignée HNT-34) reprises dans 100µl de leur milieu de culture sont déposées en triplicats dans les plaques pour une incubation de 90 minutes à 37°C (ou 30 minutes pour la lignée HNT-34). Les cellules non adhérentes sont retirées grâce à trois lavages successifs des puits au PBS. Pour chaque lignée testée, des puits contrôles, nommés « inputs », sont réalisés de la même manière mais ne sont pas lavés pour représenter le contrôle 100%. Puis, 20µl de la solution de MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Assay, Promega®) sont ajoutés dans chaque puits contenant 100µl de milieu de culture. Après 3h

d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 490 nm par le lecteur de plaque Spectramax I3 (Molecular Devices®) et le logiciel SoftMax® Pro Software (Molecular Devices®). Le pourcentage d'adhésion est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ Adhésion} = \frac{(\text{Absorbance des cellules adhérentes} - \text{blanc})}{(\text{Absorbance des inputs} - \text{blanc})} \times 100$$

2. Adhésion aux cellules HS-5 en co-culture :

Pour les expériences de co-culture, les plaques 96 puits sontensemencées 48 heures avant l'expérience avec 4×10^4 cellules HS-5 de façon à obtenir un tapis cellulaire à environ 80% de confluence le jour de l'utilisation.

1×10^6 de cellules (ou 0.5×10^6 cellules pour la lignée HNT-34) reprises dans 100µl de milieu de culture sont ensuite déposées en triplicats dans les plaques pour une incubation de 90 minutes à 37°C (ou 30 minutes pour la lignée HNT-34). Après trois lavages en PBS successifs, 60µg de D-luciférine Firefly (Perkin Elmer®) sont ajoutés dans chaque puits et la quantification des cellules adhérentes s'effectue par bioluminescence grâce à l'appareil Xenogen IVIS 50 et au logiciel Living Image 3.2 software (Perkin Elmer®). Pour chaque lignée testée, des puits contrôles sont réalisés de la même manière, mais ne sont pas lavés pour représenter le contrôle 100%. Le pourcentage d'adhésion relatif est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ Adhésion} = \frac{(\text{Radiance moyenne [p/s/cm}^2\text{/sr]} \text{ des cellules adhérentes} - \text{blanc})}{(\text{Radiance moyenne [p/s/cm}^2\text{/sr]} \text{ des inputs}) - \text{blanc}} \times 100$$

3. Adhésion aux laminines :

Des tests d'adhésion à différentes laminines (8 isoformes testées : 521, 221, 511, 211, 421, 121, 411 et 111 ; LAMscreen, BioLamina®) ont également été réalisés dans l'optique de trouver un partenaire au CD81 impliqué dans l'adhésion cellulaire. En effet, les différentes isoformes de laminines se lient préférentiellement à certaines

intégrines ; plusieurs articles relatent de l'association tétraspanines-intégrines dans les mécanismes d'adhésion-migration en oncologie (96,178,179).

La première étape a consisté en l'optimisation des concentrations en laminine permettant une adhésion, en fonction des différentes lignées cellulaires : 3 concentrations (5 ; 10 ; 20 μ g/mL) étaient testées pour chaque laminine sur les lignées cellulaires U-937 et OCI-AML3. Au vu des résultats, les concentrations de 5 et 10 μ g/mL étaient respectivement choisies pour l'adhésion des cellules de la lignée U-937 et de la lignée OCI-AML3.

Les solutions de laminines étaient décongelées lentement à 4°C puis la solution stock était diluée avec du 1X PBS contenant du Ca⁺⁺ et du Mg⁺⁺ selon la concentration pré-établie en fonction de la lignée cellulaire étudiée. 70 μ L / puits de la solution diluée étaient déposés en plaques 96 puits puis incubés pendant une nuit à 4°C.

Un million de cellules reprises dans 100 μ L de milieu de culture étaient ensuite déposées en triplicats dans les puits coatés. Trois puits « inputs » étaientensemencés avec un million de cellules seules, sans coating. Après une incubation de 90 minutes à 37°C, les puits étaient délicatement lavés au PBS afin de retirer les cellules non adhérentes (3 lavages successifs). 60 μ g de D-luciférine Firefly (Perkin Elmer[®]) sont ajoutés dans chaque puits et la quantification des cellules adhérentes s'effectue par bioluminescence grâce à l'appareil Xenogen IVIS 50 et au logiciel Living Image 3.2 software (Perkin Elmer[®]). Le pourcentage d'adhésion relatif est calculé de la même manière que pour les tests d'adhésion en co-culture.

VII) Eude de la migration cellulaire :

Des inserts de membrane en polycarbonate Transwell (5 μ m pore size; Corning[®], NY, USA) ont été placés dans des plaques 24 puits de culture cellulaire, afin d'étudier la migration cellulaire. Les plaques 24 puits étaientensemencées 24 heures avant l'expérience avec 5x10⁵ cellules HS-5, de façon à obtenir un tapis cellulaire à environ 80% de confluence le jour de l'utilisation, puis l'insert contenant 3x10⁵ cellules reprises dans 300 μ l de milieu RPMI + 10% SVF 10% était déposé dans le puits.

Après une incubation de 24 heures à 37°C, les cellules ayant migré étaient comptabilisées par bioluminescence grâce à l'appareil Xenogen IVIS 50 et au logiciel

Living Image 3.2 software (Perkin Elmer®) après ajout de 150µg/puits de D-luciférine (Perkin Elmer®). Les dépôts étaient réalisés en duplicats et un puits contrôle, contenant la même quantité de cellules déposées dans les inserts, était réalisé de façon à calculer le taux de migration en pourcentage.

La **Figure 24** représente schématiquement le plan de manipulation réalisé pour les tests de migration.

Le pourcentage de migration relatif est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ Migration} = \frac{(\text{Radiance moyenne [p/s/cm}^2\text{/sr]} \text{ des cellules ayant migré} - \text{blanc})}{(\text{Radiance moyenne [p/s/cm}^2\text{/sr]} \text{ des inputs}) - \text{blanc}} \times 100$$

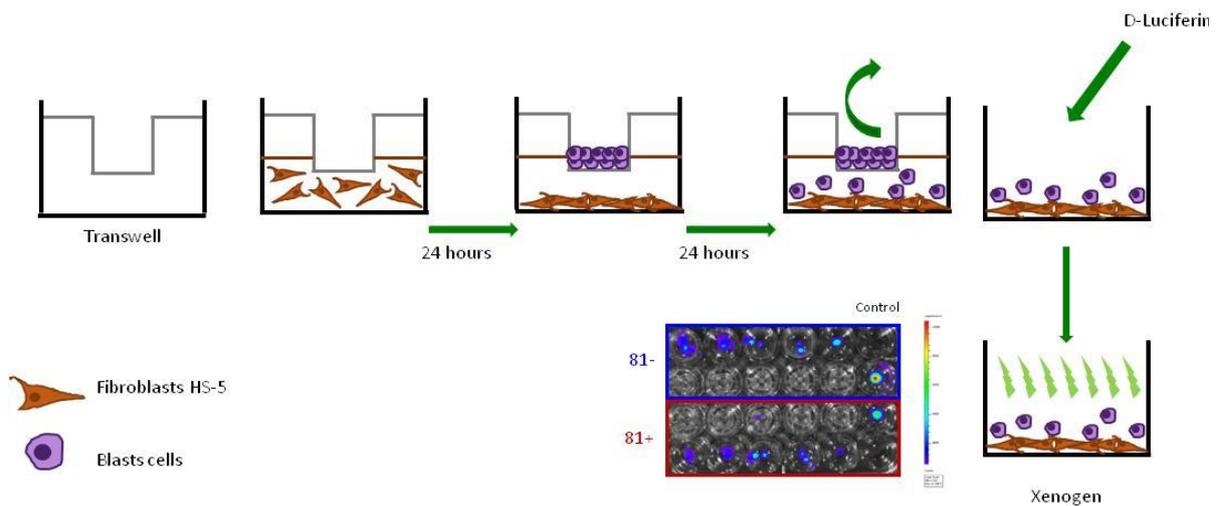


Figure 24 : Schéma représentant le plan expérimental pour les tests de migration cellulaire

VIII) Etude de l'invasion cellulaire :

Les tests d'invasion cellulaire étaient effectués de façon identique aux tests de migration mais les membranes Transwell étaient préalablement coatées avec une matrice de membrane basale extracellulaire (Cultrex 5X BME Solution, Trevigen®) selon les instructions du fabricant en utilisant 100µL de BME à une concentration de 0.1X par insert.

La **Figure 25** représente schématiquement le plan de manipulation réalisé pour les tests d'invasion cellulaire.

Le pourcentage d'invasion relatif est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ Invasion} = \frac{(\text{Radiance moyenne [p/s/cm}^2\text{/sr]} \text{ des cellules ayant migré} - \text{blanc})}{(\text{Radiance moyenne [p/s/cm}^2\text{/sr]} \text{ des inputs}) - \text{blanc}} \times 100$$

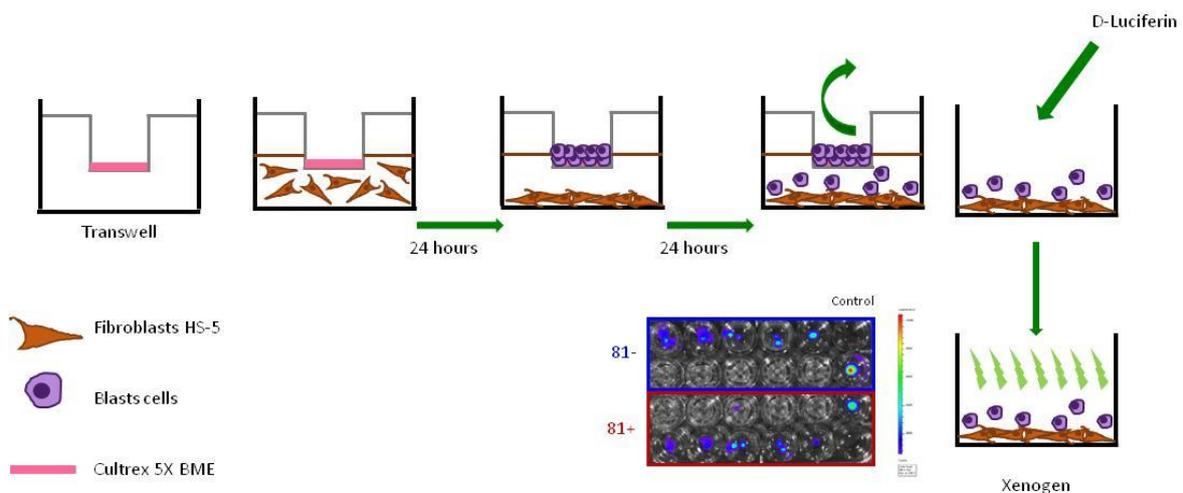


Figure 25 : Schéma représentant le plan expérimental pour les tests d'invasion cellulaire

BME : Basement Membrane Matrix

IX) Analyse morphologique des cellules :

1. Par cytométrie en flux :

Les données collectées au cours des tests de prolifération grâce au cytomètre Cell Lab Quanta MPL Analyseur Beckman Coulter® ont été analysées afin de mesurer le volume électronique moyen pour chaque lignée cellulaire.

2. Par microscopie confocale :

Les cellules ont été cultivées pendant 24 heures à 37°C dans leur milieu respectif à l'intérieur de chambres Nunc Lab-Tek II (ThermoFisher Scientific®), préalablement

coatées avec de la Poly-D-Lysine (ThermoFisher Scientific®) à une concentration de 60 000 cellules/cm². Les chambres étaient ensuite rincées avec du PBS à 37°C. Les cellules adhérentes étaient immédiatement fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes à température ambiante ; puis abondamment lavées et perméabilisées grâce à une solution de 0,1% Triton X-100 PBS pendant 10 minutes à température ambiante.

Après 3 lavages successifs de 5 minutes, une étape de saturation était ensuite réalisée en incubant les chambres avec du PBS- 2% BSA pendant 45 minutes à température ambiante.

Après 3 lavages successifs de 5 minutes, les cellules étaient marquées avec de la phalloïdine couplée à un fluorochrome Alexa Fluor 488 (Invitrogen, ThermoFischer Scientific®) diluée au 1/40^{ème} (concentration stock = 66µM) dans l'obscurité pendant 30 minutes. Après rinçage, les noyaux étaient marqués grâce au DAPI (ThermoScientific®), dilué au 1/10000^{ème} pendant 10 minutes.

Toutes les photographies ont été réalisées à l'aide du microscope confocal (Zeiss LSM710 confocal microscope; Carl Zeiss®).

Un programme a été élaboré sur le logiciel ImageJ® afin de pouvoir calculer la circularité.

X) Modèles *in vivo* :

1. Animaux:

Le modèle animal utilise des souris NSG (NOD/SCID/IL-2R γ C^{null}) (Charles River Laboratories®) qui sont des souris immunodéficientes ne possédant ni lymphocytes B, ni lymphocytes T, ni cellules NK et déficientes pour le gène du récepteur à l'IL-2. Ces animaux étaient hébergés dans l'animalerie EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) de la plateforme de ressources expérimentales au sein de l'Université de Lille.

Les manipulations réalisées ont été approuvées par un comité d'éthique spécialisé en expérimentation animale (#309762015120414583482V3).

La **Figure 26** représente les différentes manipulations réalisées à partir du modèle animal avec les différents mécanismes étudiés.

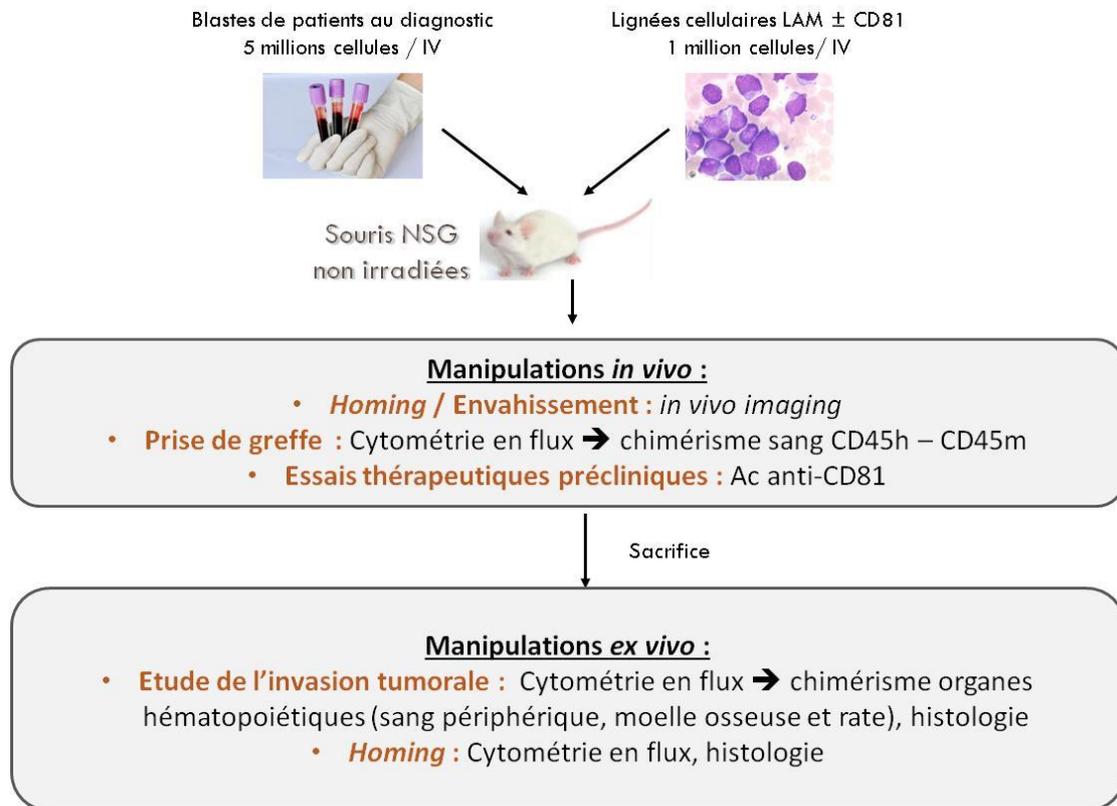


Figure 26 : Protocole expérimental du modèle animal utilisé

2. Etude de la prise de greffe des lignées cellulaires modifiées :

Les xénogreffes de lignées cellulaires modifiées U-937 et OCI-AML3 étaient réalisées par injection intraveineuse (IV) d'un million de cellules dans 100µl de PBS dans la veine caudale sur des souris NSG non irradiées. La prise de greffe pouvait être suivie toutes les 48 à 72 heures en utilisant la bioluminescence du modèle cellulaire grâce à l'appareil Xenogen IVIS 50 et au logiciel Living Image 3.2 software (Perkin Elmer®) après avoir injecté aux souris 150 mg de luciférine/kg de poids en intra-péritonéal (IP). Afin d'évaluer la prise de greffe dans le sang, les souris sont également prélevées dans la veine du sinus maxillaire toutes les 1 à 2 semaines. Après lyse des globules

rouges, le marquage est réalisé grâce aux anticorps anti-humain CD45 FITC et anti-murine CD45 APC (Biolegend®) (**Tableau VIII**). Les échantillons sont ensuite passés sur le cytomètre LSR FORTRESSA X20 (BD Biosciences®) puis les données analysées grâce au logiciel FlowJo (Tree Star®).

Le pourcentage de prise de greffe (chimérisme) correspond au pourcentage de cellules marquées par l'anti-CD45 humain CD45 parmi les cellules sanguines totales.

3. Etude de la prise de greffe des cellules de patients LAM au diagnostic :

La moelle osseuse des patients atteints de LAM était prélevée au diagnostic sur tubes EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) pour être acheminée au laboratoire. Une séparation par gradient de Ficoll (Pancoll, Dutscher®, Brumath, France) était réalisée afin d'isoler les cellules mononuclées. Après lavage, une lyse des globules rouges résiduels était effectuée en appliquant 5mL de tampon de lyse (ammonium chloride 0.8%) à chaque culot cellulaire pour une incubation de 5 minutes.

Si nécessaire, une déplétion en lymphocytes était ensuite réalisée par sélection négative à l'aide du kit EasySep Human PE (Stemcell® ; 18551) et des anticorps anti CD3 humain-PE (Beckman Coulter® ; A07747) pour les lymphocytes T et anti CD19 humain-PE (Beckman Coulter® ; A07769) pour les lymphocytes B selon les instructions du fabricant. Après deux lavages en PBS stérile, 5×10^6 cellules/souris étaient injectées dans la veine caudale.

La prise de greffe était suivie par cytométrie en flux, selon le même protocole que pour les xénogreffes obtenues avec les lignées cellulaires, à un rythme bimensuel.

4. Etude de l'invasion tumorale au sacrifice :

Les souris étaient sacrifiées par dislocation cervicale lorsque le pourcentage de blastes circulants atteignait 70% (pour les PDX) ou que les souris montraient des signes cliniques de leucémie (altération de l'état général avec asthénie, anorexie, amaigrissement ou signes d'atteinte neurologique : prostration, déficit moteur). Une analyse macroscopique a été effectuée à la recherche de tumeurs périphériques. Le

foie, la rate, les 2 fémurs et les 2 tibias sont ensuite prélevés et les organes hématopoïétiques secondaires (foie, rate) pesés. Une suspension monocellulaire est obtenue par flushs de la moelle osseuse ou dilacération de la rate. 500 000 cellules sont marquées avec les anticorps anti-humain CD45 FITC et anti-murin CD45 APC (Biolegend®) (Tableau VIII) afin d'observer l'envahissement médullaire, splénique et hépatique.

5. Etude de l'envahissement tumoral par immunohistochimie :

Afin de préciser la localisation des cellules leucémiques ; les fémurs, tibias et sternums de certaines xéno greffes de lignées cellulaires ont été prélevés soit de façon précoce (phénomène de *homing*) ou plus tardive (envahissement). Des souris contrôles avaient reçu une injection de PBS à J0.

Les os étaient fixés dans du paraformaldéhyde 4% (pH 7.0-7.6; ChemCruz®) pendant une nuit à 4°C, puis décalcifiés avec une solution de DC1 (Q Path®) pendant 6 à 18 heures ; puis déshydratés et inclus en paraffine. Les marquages CD45 ont été réalisés sur des coupes tissulaires de 4µm d'épaisseur grâce à l'automate Benchmark Ultra (Roche tissue diagnostics®) avec l'anticorps anti-CD45 humain (Dako, M0701, Agilent®) utilisé au 1/200^{ème} et révélés avec le kit UltraView DAB IHC Detection Kit (Ventana®). Des témoins négatifs sans marquage par anticorps anti-CD45 étaient effectués en parallèle pour vérifier la spécificité du signal.

6. Traitement des cellules par anticorps anti-CD81 avant xéno greffes :

L'anticorps anti-CD81 clone JS-81 (BD Biosciences®) a été utilisé pour traiter la lignée cellulaire OCI-AML3 à la concentration de 10x10⁶ cellules/mL avec 1µg d'anticorps par million de cellules. Le temps de blocage avant xéno greffes est de 4 heures. Les xéno greffes et leurs suivis étaient réalisés selon le même protocole que pour l'étude de la prise de greffe des lignées cellulaires modifiées.

XI) Etude des exosomes :

1. Isolation des vésicules extracellulaires:

$6,5 \times 10^6$ cellules étaient mises en culture à une concentration de $0,5 \times 10^6$ cellules/mL dans un milieu de culture « exosome-free » obtenue par ultracentrifugation de 16 heures à 100 000g. Après 48h d'incubation, un comptage et un test de viabilité étaient réalisés de façon à normaliser la quantification des exosomes par le nombre de cellules. Le milieu de culture était centrifugé à 2 000g à 4°C pendant 10 minutes de façon à éliminer les cellules et débris cellulaires.

Les exosomes étaient isolés par ultracentrifugations différentielles (UCD) : une première centrifugation à 20 000g pendant 45 minutes à 4°C était effectuée de façon à éliminer une grande partie des corps apoptotiques et microparticules, suivie d'une deuxième centrifugation à 100 000g pendant 1 heure à 4°C (ultracentrifugeuse Optima L-90 K, rotor SW 41 Ti, k-factor : 124, tubes Ultra-Clear (BC®, référence : 344059)). Le culot était repris dans un volume de PBS de façon à obtenir un volume total de 260 μ L : 10 μ L étaient utilisés pour la quantification des particules extracellulaires (PEs).

La **Figure 27** illustre le plan expérimental suivi pour l'isolation des exosomes.

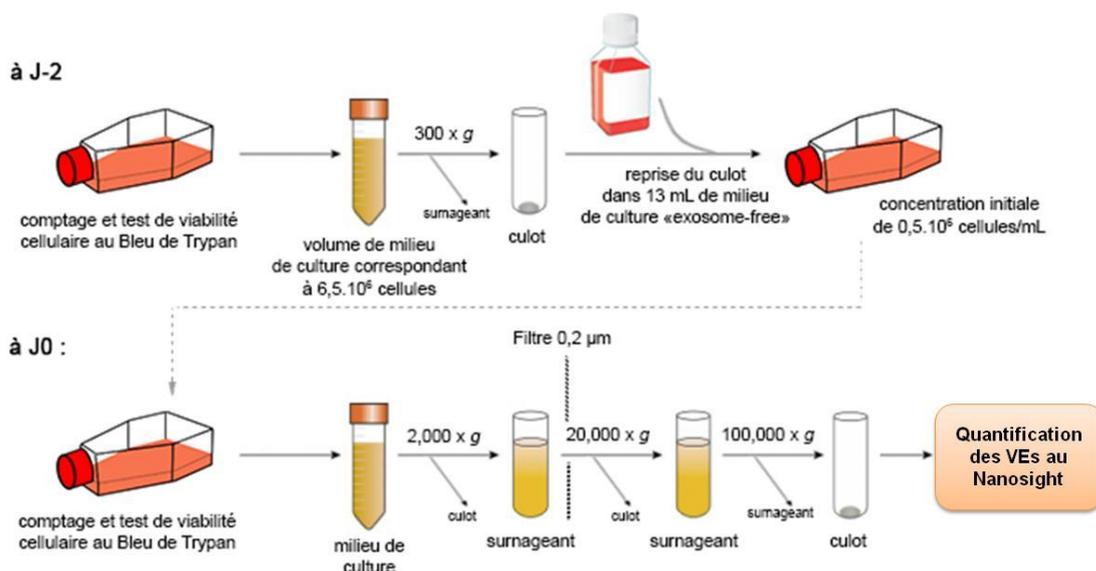


Figure 27 : Schéma du plan expérimental utilisé pour l'isolation des vésicules extracellulaires (VEs)

2. Quantification des vésicules extracellulaires :

Les vésicules extracellulaires étaient comptées grâce à l'appareil NanoSight NS300 (Malvern®, Orsay, France).

Le fonctionnement de cet appareil repose sur la technologie d'analyse du suivi individuel des particules qui combine les propriétés de diffusion de la lumière et du mouvement Brownien pour déterminer la distribution de tailles et la concentration des particules en suspension dans un liquide. Un faisceau laser traverse la chambre d'analyse et les particules en suspension présentes sur la trajectoire de ce faisceau diffusent la lumière de telle sorte qu'elles peuvent être facilement visualisées avec un microscope (20x) équipé d'une caméra.

L'ensemble des analyses était réalisé avec le laser 488 nm, un débit de pousse-seringue de 20µL/min, un « camera level » de 14 et un seuil de détection de 5.

Cinq vidéos de 60 secondes par échantillon étaient enregistrées. Tous les échantillons étaient dilués à 1/100^{ème} dans du PBS filtré (0.2µm) de façon à obtenir une concentration en particules comprise entre 10⁷ et 10⁹ particules/mL lors du passage de l'échantillon au Nanosight.

L'analyse par le logiciel NTA (version 3.2 ; NanoSight Ltd.) permettait d'obtenir la concentration en particules (exprimée en nombre de particules/mL) en fonction de leur taille.

Seules les particules d'un diamètre inférieur ou égal à 100nm étaient prises en compte dans nos analyses, ce seuil correspondant à la limite supérieure de taille classiquement retenue pour les exosomes.

Le nombre de particules par cellule (Nb. Exo.) était calculé en moyennant les résultats des 5 vidéos et en prenant en compte le facteur de dilution (dil.), le volume (vol.) de PBS dans lequel était repris le culot de VEs au décours de la deuxième ultracentrifugation, le volume initial de milieu de culture, la concentration cellulaire au moment de l'isolation des exosomes et en soustrayant le nombre de PEs contenues dans le milieu de culture « exosome free » déterminé par méthode NTA après le même protocole d'isolation. La formule utilisée était la suivante :

$$Nb. Exo = \frac{(Conc. PEs < 100nm) \times (dil.) \times (vol. PBS) - (PEs < 100nm \text{ du milieu « exosome free »})}{(vol. milieu de culture \text{ à } J0) \times (conc. cellulaire \text{ du milieu de culture à } J0)}$$

XII) Analyses statistiques :

Les variables quantitatives ont été exprimées en moyennes et déviations standards et comparées par l'utilisation d'un T-test non apparié pour les larges échantillons ($n > 10$) ou par un test de Mann Whitney pour les petits échantillons.

Pour les données des PDX, la prise de greffe en fonction de l'expression de CD81 a été étudiée grâce à un modèle de Cox et la corrélation entre l'expression de CD81 et le temps de prise de greffe à l'aide d'une corrélation de Spearman.

Tous les tests statistiques ont été réalisés de façon bilatérale et la limite de significativité a été définie à 0.05. Les graphiques et analyses ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Software version 5.

Résultats

Partie I disponible en Annexe I

Boyer T, Gonzales F, Barthélémy A, Marceau-Renaut A, Peyrouze P, Guihard S, et al. Clinical Significance of ABCB1 in Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Study. *Cancers (Basel)*. 6 sept 2019;11(9) (177).

Partie II.

I) Evaluation de l'expression basale du CD81 dans les différentes lignées cellulaires :

Afin d'évaluer les niveaux d'expression du CD81 sur les lignées de LAM, un marquage membranaire par cytométrie en flux est réalisé (**Figure 28**).

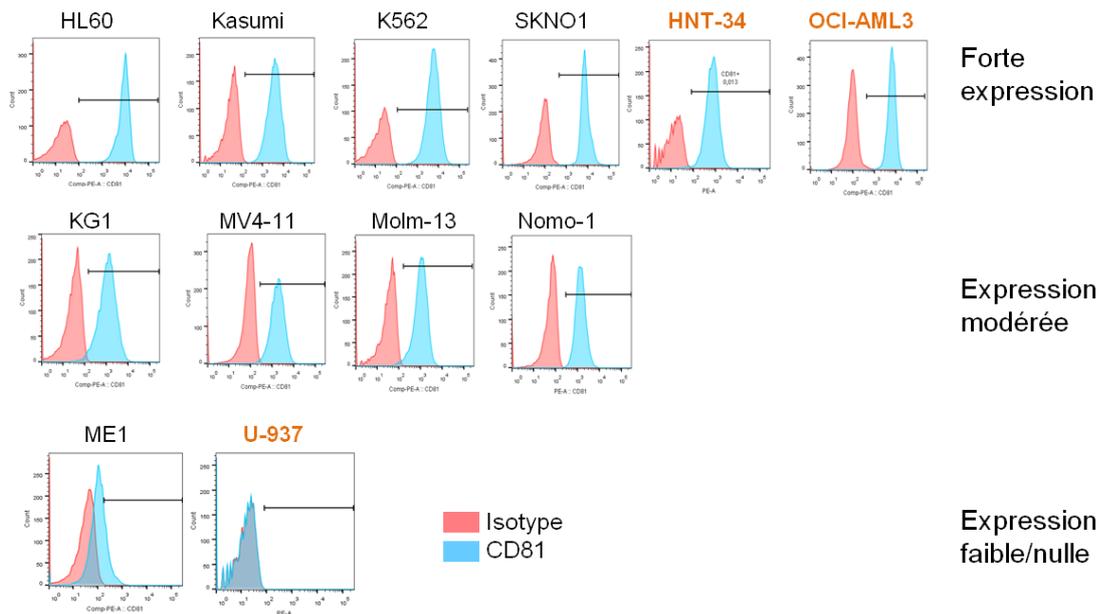


Figure 28 : Profil d'expression du CD81 à l'état basal sur les lignées cellulaires de LAM en cytométrie en flux

Au vu du profil d'expression du CD81 à l'état basal, il a été décidé d'utiliser des anticorps bloquants sur les lignées cellulaires exprimant fortement le CD81 (OCI-AML3), de réaliser une surexpression de CD81 dans une lignée ne l'exprimant pas (U-937) et de sous réguler son expression dans des lignées l'exprimant fortement (OCI-AML3 et HNT-34).

II) Validation des 3 modèles d'expression différentielle de CD81 :

L'expression de CD81 à l'état basal et après modulation d'expression par les méthodes décrites ci-dessus est représentée dans la **Figure 29**. L'expression de CD81 a été évaluée par cytométrie en flux, qPCR et Western Blot.

Pour la lignée U-937, une surexpression stable de CD81 était obtenue.

Pour les lignées de sous-expression, les trois différents shARN utilisés permettent une diminution de l'expression de CD81 ; en cytométrie de flux, le sh433 apparaît comme étant le plus efficace dans les deux lignées.

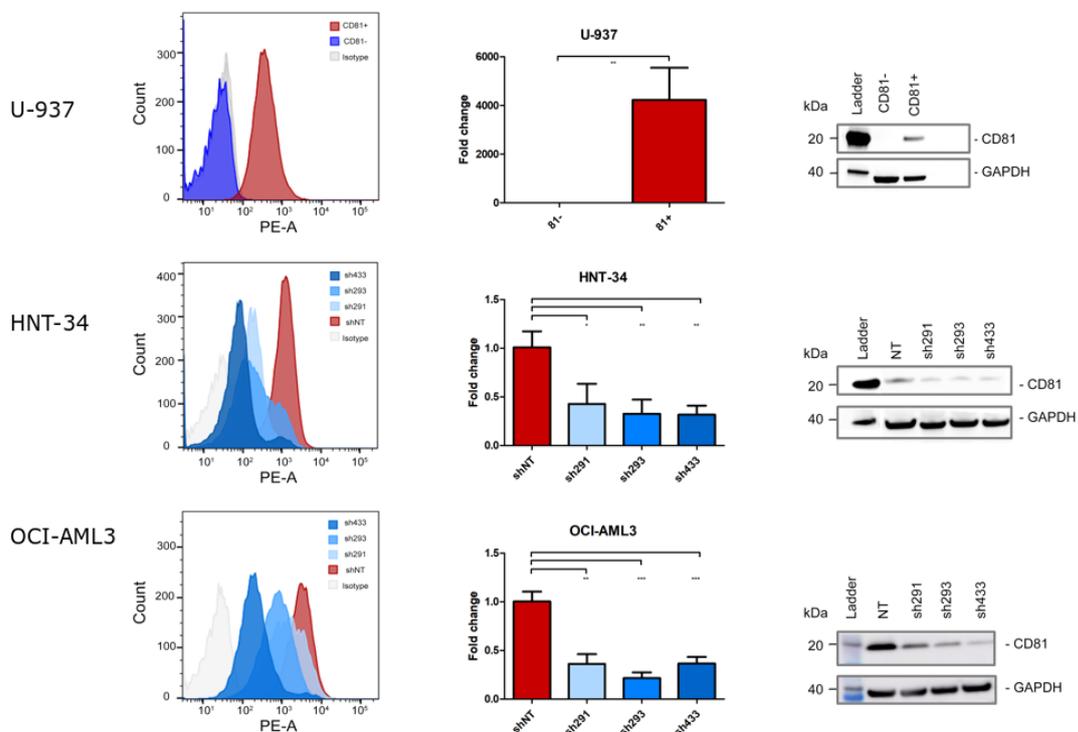


Figure 29 : Expression différentielle de CD81 en fonction des lignées cellulaires utilisées

L'expression de CD81 a été vérifiée en cytométrie en flux, qPCR et par Western Blot pour chaque lignée et comparée à la fraction négative pour la lignée U-937, au shNT (non-targeting) pour les lignées OCI-AML3 et HNT-34.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

III) Etude de la chimiosensibilité :

Dans notre modèle de surexpression du CD81, les cellules CD81+ avaient une chimiorésistance forte à la daunorubicine (DNR). Ces résultats étaient confirmés par les deux modèles de sous-expression du CD81 dans lesquels les cellules exprimant le sh433 étaient plus chimiosensibles que les shNT.

L'utilisation d'anticorps bloquants sur le modèle de surexpression ne permettait pas de réverser les effets obtenus (données non montrées) ; en revanche, l'utilisation de ces anticorps sur le modèle OCI-AML3 permettait de rendre les cellules bloquées plus chimio-sensibles à la daunorubicine (**Figure 30**).

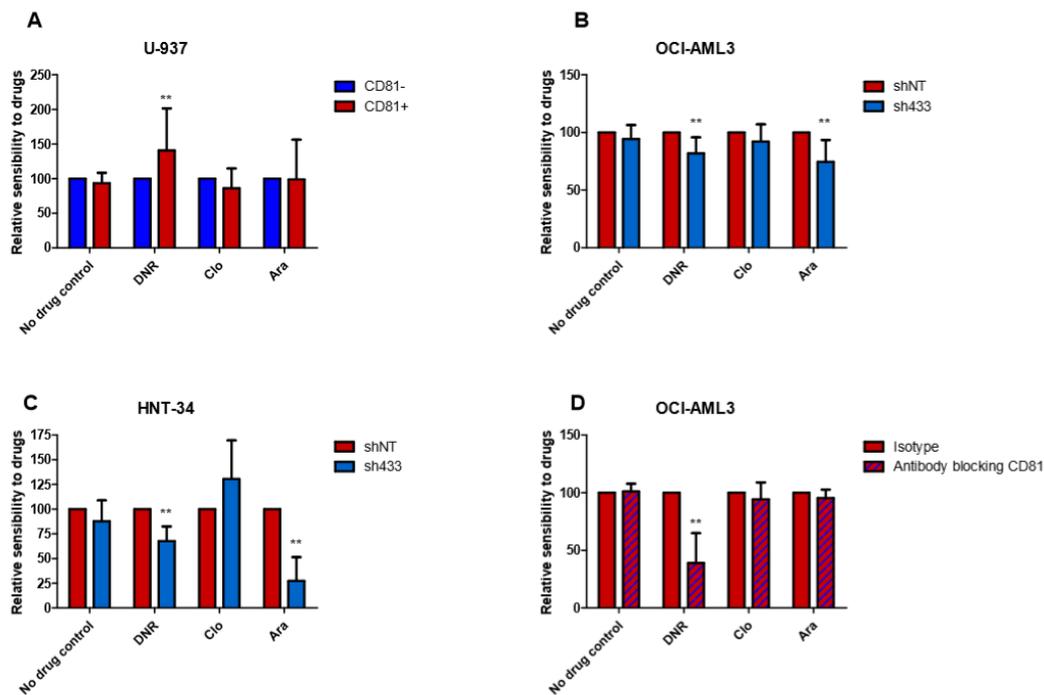


Figure 30 : Etude de la chimiosensibilité en fonction de l'expression de CD81.

Les cellules CD81+ du modèle de surexpression U-937 sont plus résistantes à la daunorubicine ($p=0.008$; $n=9$) (A) ; ceci est vérifié dans les deux modèles de sous-expression avec le sh433 ($p=0.001$; $n=4$ et $p=0.006$; $n=6$) respectivement pour les lignées OCI-AML3 (B) et HNT-34 (C). Pour ces deux lignées, les cellules sh433 sont également plus sensibles à l'aracytine que les cellules shNT ($p=0.001$; $n=4$ et $p=0.006$; $n=6$) respectivement pour les lignées OCI-AML3 (B) et HNT-34 (C). L'utilisation d'anticorps bloquants (SC) sur la lignée OCI-AML3 rend les cellules bloquées plus chimiosensibles à la daunorubicine ($n=7$) (D).

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

Les tests de chimiorésistance réalisés en co-culture avec les fibroblastes HS-5 montrent une plus grande chimiorésistance pour les cellules U-937-CD81+ versus U-937-CD81- mais les résultats n'atteignent pas la significativité et cela n'a pas été vérifié avec la lignée OCI-AML3 shCD81.

IV) Impact de l'expression de CD81 sur la prolifération cellulaire :

L'expression de CD81 n'a aucun impact sur la prolifération cellulaire, que ce soit en comptage cellulaire ou avec les tests de clonogénicité ; et ce, pour les trois lignées cellulaires testées (***Figure 31***).

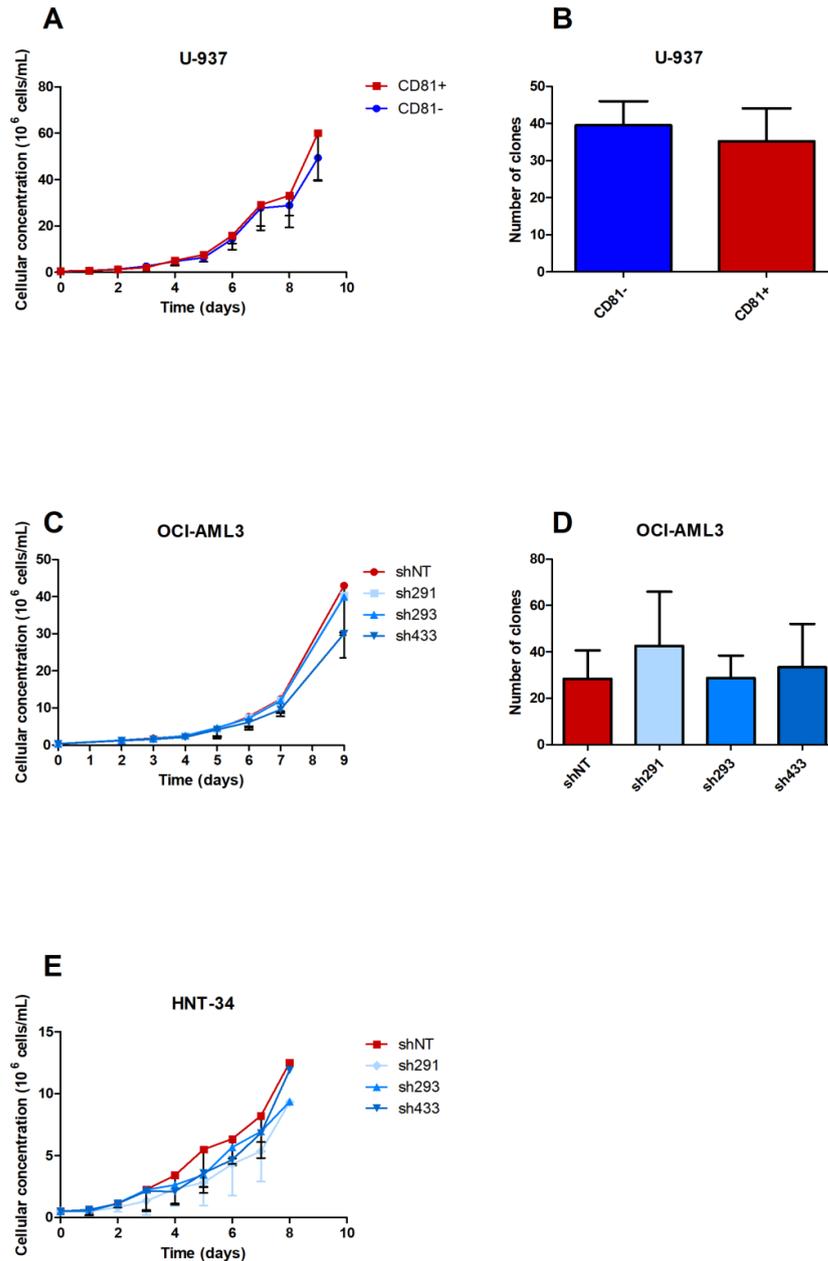


Figure 31 : L'expression de CD81 n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire

Il n'y a pas d'impact de l'expression de CD81 sur la prolifération cellulaire, mesurée à la fois par comptage au cytométrie de flux pour les lignées U-937 (n=6 ; NS) (A) ; OCI-AML3 (n=6 ; NS) (C) ou HNT-34 (n=5 ; NS) (E) ; ou avec les tests de clonogénicité pour les lignées U-937 (n=3 ; NS) (B) et OCI-AML3 (n=4 ; NS) (D)

Nous avons étudié le cycle cellulaire sur la lignée de surexpression et avec les anticorps bloquants. Les proportions de cellules engagées dans les différentes phases du cycle cellulaire n'étaient pas modifiées par l'expression de CD81.

V) Impact de l'expression de CD81 sur l'adhésion cellulaire :

1. Adhésion cellulaire à la fibronectine :

Les tests d'adhésion à la fibronectine montrent qu'une forte expression de CD81 est associée à une adhésion cellulaire augmentée. Ceci a été vérifié pour les modèles de sur- et sous-expression du CD81 (**Figure 32**).

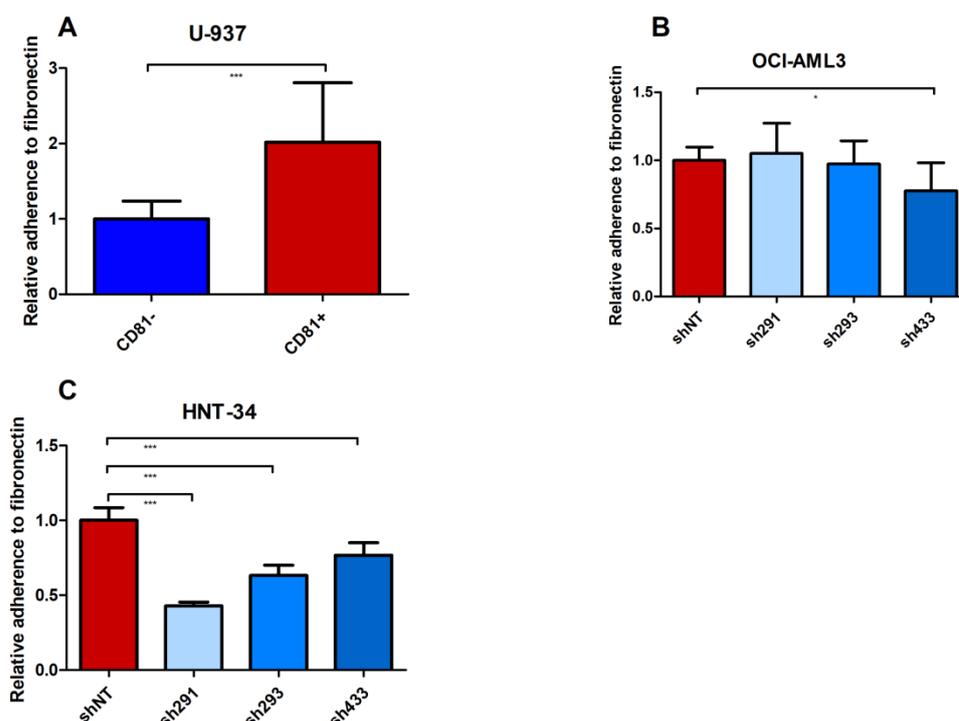


Figure 32 : L'expression de CD81 est corrélée à l'adhésion cellulaire à la fibronectine.

La surexpression de CD81 sur la lignée U-937 augmente l'adhésion à la fibronectine (A) ($n=4$; $p=0.0003$). A contrario, la down-régulation de CD81 diminue l'adhésion cellulaire à la fibronectine sur les lignées OCI-AML3 ($n=3$) (B) et HNT-34 ($n=3$) (C).

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

Des tests d'adhésion sur la lignée U-937 après blocage par les anticorps anti-CD81 (SC et BD) ne réversent pas l'effet observé (**Figure 33 ; B**).

De la même façon, les tests réalisés avec milieux conditionnés dans l'hypothèse d'une action des exosomes sur l'adhésion cellulaire (cellules CD81- incubées dans

du milieu de culture conditionné des cellules 81+) ne montraient pas de différence (**Figure 33 ; A**).

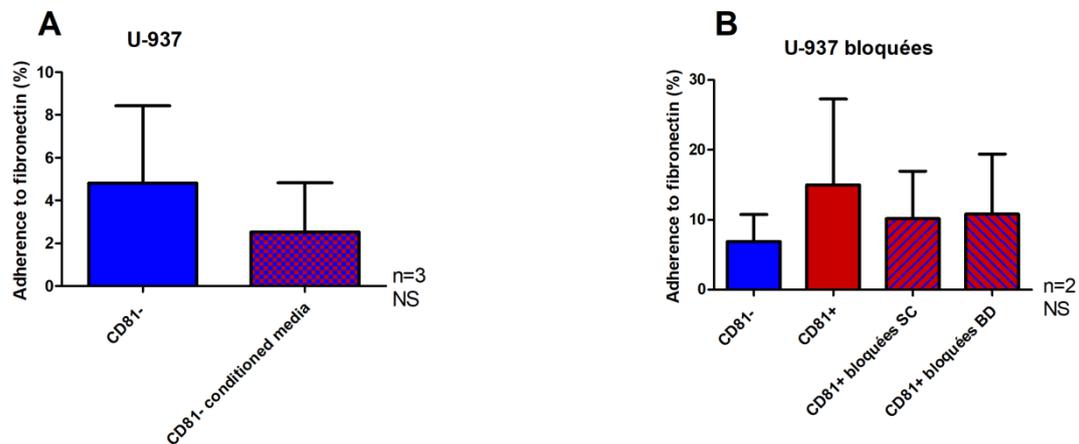


Figure 33 : Tests d'adhésion à la fibronectine avec cellules 81- en milieu conditionné 81+ (A) et après blocage des cellules CD81+ par un anticorps bloquant (B)

2. Adhésion cellulaire en co-culture :

Les tests d'adhésion en co-culture avec des fibroblastes humains HS-5 confirment les résultats obtenus avec la fibronectine, à savoir une plus forte adhésion cellulaire lorsque les cellules sont CD81+ pour le modèle de surexpression et une plus faible adhésion avec les cellules CD81- (sh433 uniquement) dans les deux modèles de sous-expression (**Figure 34**).

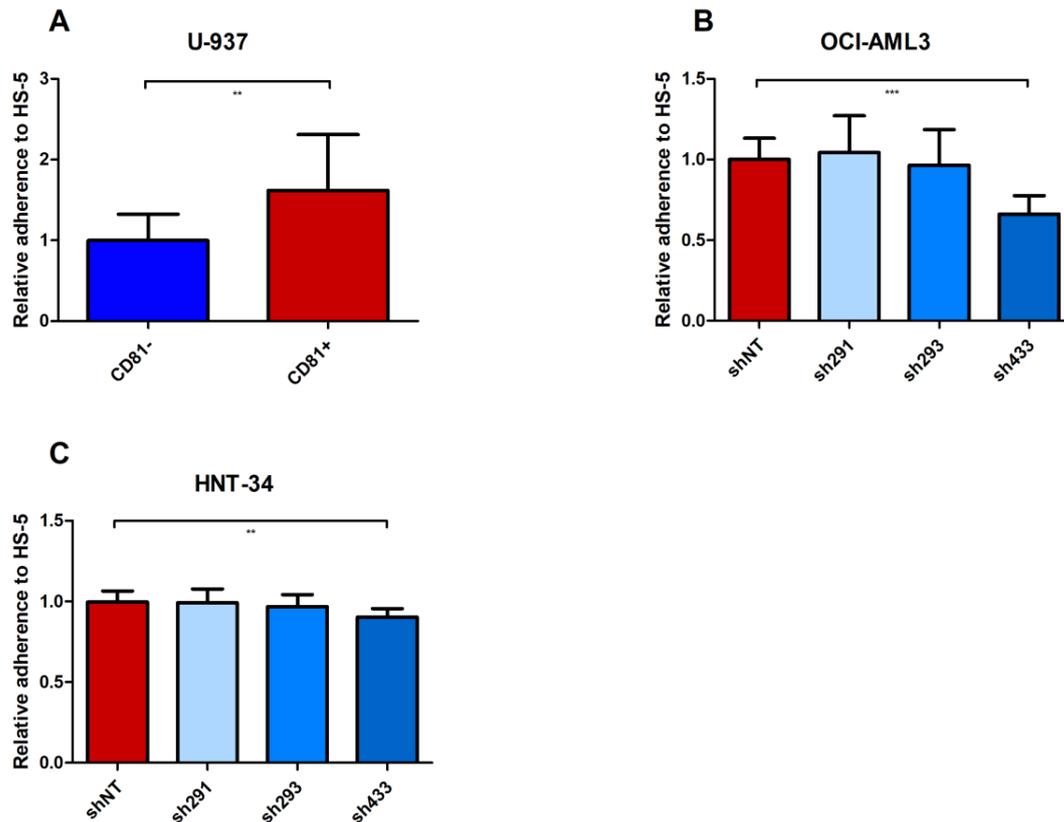


Figure 34 : L'expression de CD81 est corrélée à l'adhésion cellulaire en co-culture avec des fibroblastes HS-5

La surexpression de CD81 dans la lignée cellulaire U-937 augmente l'adhésion aux fibroblastes (A) ($n=5$; $p=0.0043$). A contrario, la down-régulation de CD81 diminue l'adhésion cellulaire aux HS-5 dans les lignées cellulaires OCI-AML3 sh433 ($n=5$; $p<0.0001$) (B) et HNT-34 sh433 ($n=4$; $p=0.0017$) (C).

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

3. Adhésion aux laminines :

Le but des expériences d'adhésion aux laminines était d'essayer de montrer une association préférentielle à un certain type de laminine puisqu'il est connu que certaines laminines se lient spécifiquement à certaines intégrines, celles-ci faisant partie du réseau des tétraspanines. Cela aurait pu nous orienter vers un éventuel partenaire de CD81 pour son rôle dans l'adhésion cellulaire.

Dans les expériences d'adhésion cellulaire aux laminines, les résultats étaient discordants en fonction des lignées cellulaires testées, montrant une plus forte

adhésion des cellules CD81+ à la laminine 411 pour la lignée U-937 et à la lamine 511 pour la lignée OCI-AML3.

Il a été démontré que l'interaction laminine-intégrines se faisait grâce à la chaîne α des laminines ; les laminines possédant une chaîne $\alpha 5$ (laminines 511 et 521 par exemple) se lie à l'intégrine $\alpha 3\beta 1$, tandis que les laminines possédant une chaîne $\alpha 4$ (laminines 411 et 421 par exemple) se lient aux intégrines $\alpha 6\beta 1$ ou $\alpha 7X1\beta 1$ (180). Il était donc difficile de tirer des conclusions de ces résultats pour la recherche d'un partenaire de CD81 (**Figure 35**).

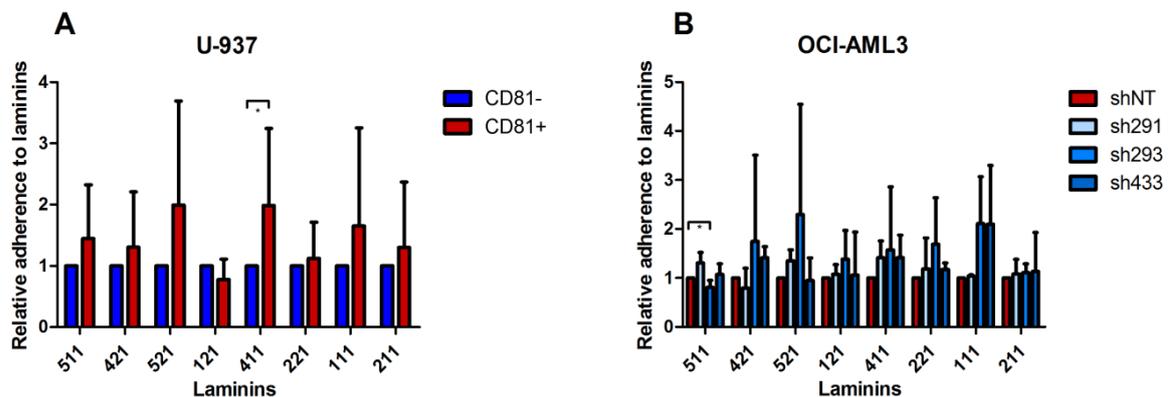


Figure 35 : Adhésion cellulaire aux différents isoformes de laminine et expression de CD81

Pour la lignée U-937, il est retrouvé une association entre surexpression de CD81 et augmentation de l'adhésion, seulement avec la laminine 411 (A) ($n=4$, $p=0.04$). Pour la lignée OCI-AML3, seule la lamine 511 est associée à une diminution de l'adhésion cellulaire dans la lignée de sous-expression sh293 (B) ($n=3$; $p=0.03$).

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

VI) Impact de l'expression de CD81 sur la migration :

Dans un premier temps, nous avons mesuré les capacités de migration libre des cellules CD81+ et CD81- (dans le modèle de surexpression) d'un milieu pauvre en SVF (1%) vers un milieu enrichi en SVF (10%). Il n'y avait pas de différence entre les cellules CD81+ et CD81- (**Figure 36 ; A**).

Nous avons donc dans un deuxième temps effectué des tests de migration en co-culture avec les cellules HS-5.

Les cellules exprimant fortement le CD81 migraient plus vers les fibroblastes HS-5 que celles qui l'exprimaient faiblement.

Cela a été montré dans le modèle de surexpression et dans le modèle OCI-AML3 de sous-expression. Les résultats n'étaient pas significatifs pour la lignée HNT-34 (**Figure 36**).

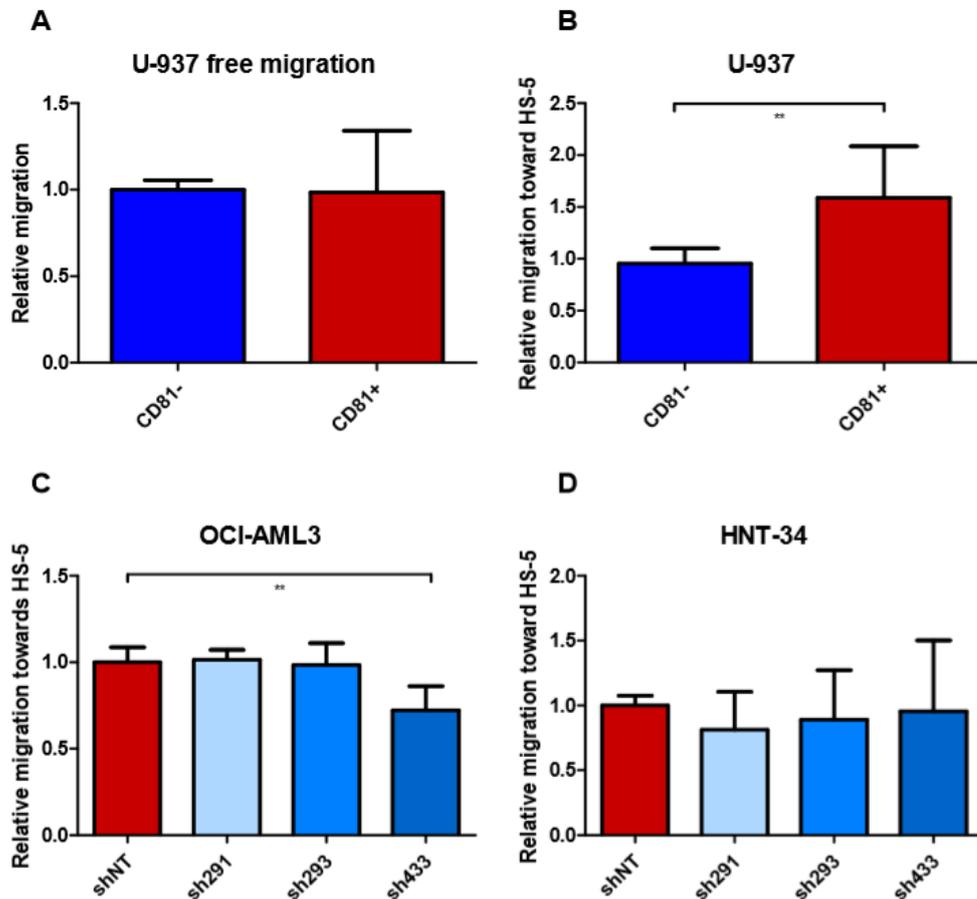


Figure 36 : Association entre expression forte de CD81 et migration cellulaire augmentée vers les fibroblastes

Pour la lignée U-937, il n'y a pas de différence de migration libre entre les cellules CD81+ et CD81- (n=3 ; NS) (A) ; en revanche, les cellules CD81+ migrent plus facilement vers les fibroblastes HS-5 (n=5 ; p=0.0011) (B). Pour les lignées de sous expression, la migration est moins importante avec le sh433 pour la lignée OCI-AML3 (n=3 ; p=0.0022) (C) et les résultats ne sont pas significatifs avec la lignée HNT-34 (n=4) (D).

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

VII) Impact de l'expression de CD81 sur l'invasion cellulaire :

Les tests d'invasion en Matrigel en présence de fibroblastes HS-5 montrent une plus grande invasion des cellules CD81+ par rapport aux cellules CD81- dans les trois modèles étudiés (**Figure 37**).

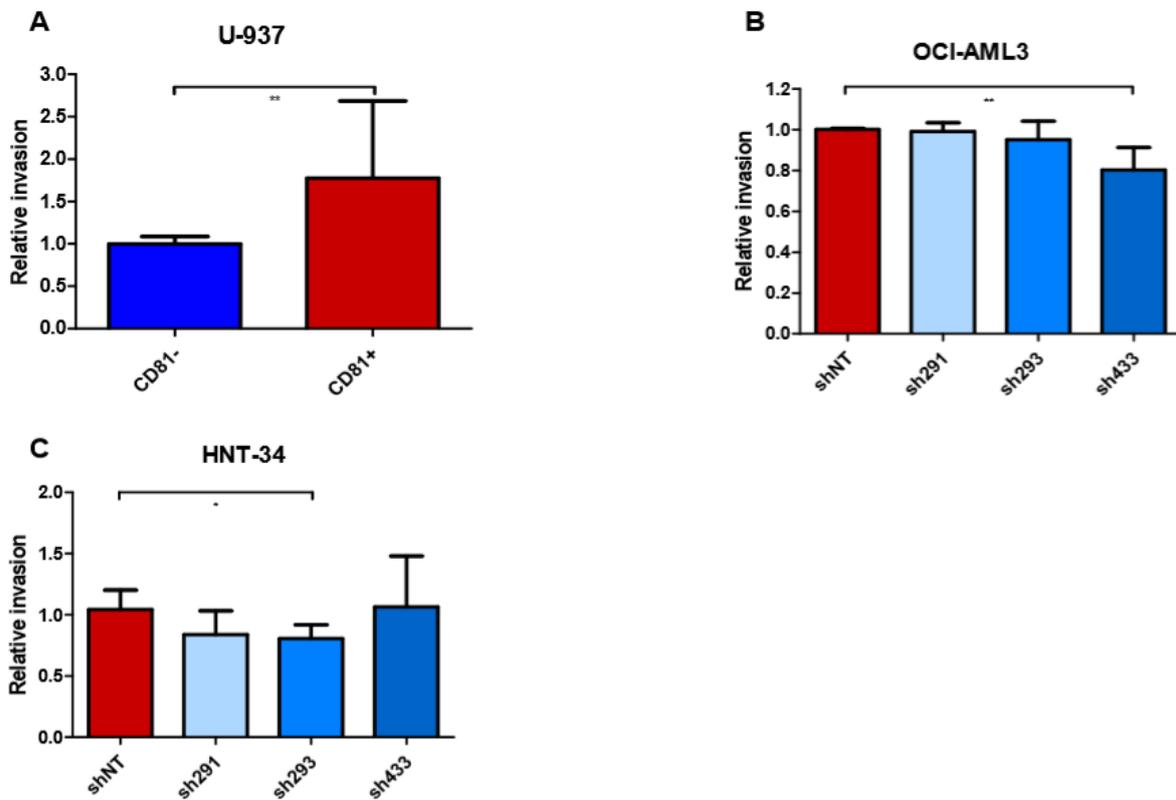


Figure 37 : Association entre forte expression de CD81 et invasion cellulaire augmentée vers les fibroblastes

Pour la lignée U-937, l'invasion cellulaire est plus importante pour les cellules CD81⁺ (n=6 ; p=0.0036) (A). A contrario ; dans les lignées de sous-expression, l'invasion cellulaire est diminuée respectivement pour le construit sh433 de la lignée OCI-AML3 (n=3 ; p=0.0022) (B) et le construit sh293 de la lignée HNT-34 (n=3, p=0.03) (C).

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

VIII) Etude morphologique et expression de CD81 :

1. Diamètre cellulaire :

Sur les trois modèles de lignées cellulaires de LAM testées, il a été montré une association statistiquement significative entre une forte expression de CD81 et un plus faible diamètre cellulaire (**Figure 38**).

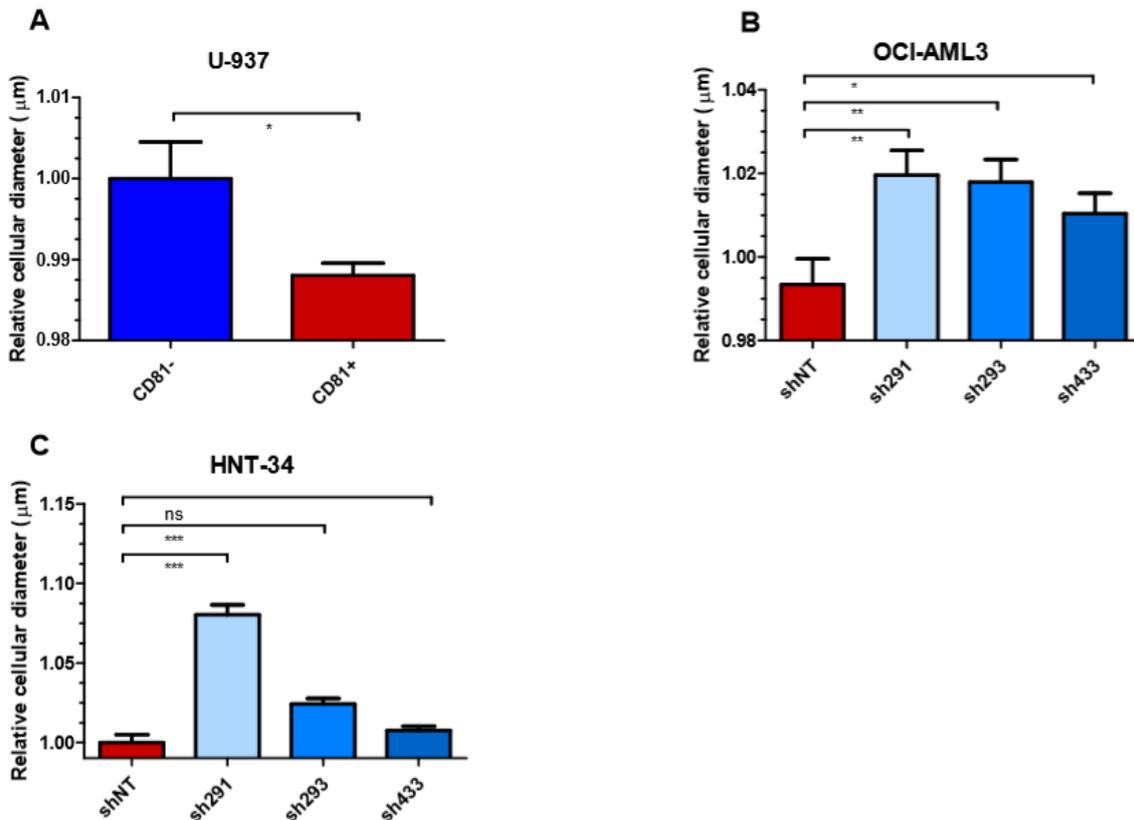


Figure 38 : L'expression de CD81 est associée au diamètre cellulaire.

Dans le modèle de surexpression, les cellules CD81⁺ sont plus petites ($n=89$; $p=0.01$) (A) ; a contrario, dans les modèles de sous-expression, les cellules shARN CD81 ont un diamètre cellulaire augmenté ($n=34$; $p=0.003$, $p=0.004$, $p=0.035$ respectivement pour les cellules sh291, 293 and 433 dans la lignée OCI-AML3 (B) et $n=32$; $p<0.0001$, $p=0.0005$, ns respectivement pour les cellules sh291, 293 and 433 de la lignée HNT-34 (C)).

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

Dans les modèles de sous-expression, la différence de diamètre la plus importante était observée avec les cellules sh291, notamment pour la lignée HNT-34. En microscopie, j'ai pu observer que cette lignée formait très facilement des agglomérats cellulaires, contrairement aux deux autres shARN, pouvant expliquer la grande différence observée. Pour autant, ceci ne semble pas avoir d'effet sur l'adhésion puisque ce shARN ne se distingue pas des deux autres dans les tests d'adhésion cellulaire à la fibronectine et en co-culture.

2. Circularité :

Les immunomarquages CD81, initialement réalisés pour confirmer la localisation membranaire de la protéine, montraient la présence de protrusions membranaires sur les cellules exprimant fortement cette protéine mais ce marquage ne permettait pas de comparer les cellules CD81+ et CD81-.

Grâce à des marquages du cytosquelette avec la phalloïdine, j'ai pu observer une plus grande quantité de protrusions membranaires pour les cellules CD81+ dans le modèle de surexpression et une moindre quantité de protrusions membranaires dans les cellules shARN CD81 pour les modèles de sous-expression.

Afin de quantifier ce phénomène, nous avons mis au point une macro grâce au logiciel ImageJ pour calculer la circularité des cellules. Cette analyse de plusieurs images acquises en microscopie confocale montre une plus grande circularité des cellules shCD81 dans les deux modèles de sous-expressions et une plus grande circularité dans les cellules CD81- du modèle de surexpression (**Figure 39**).

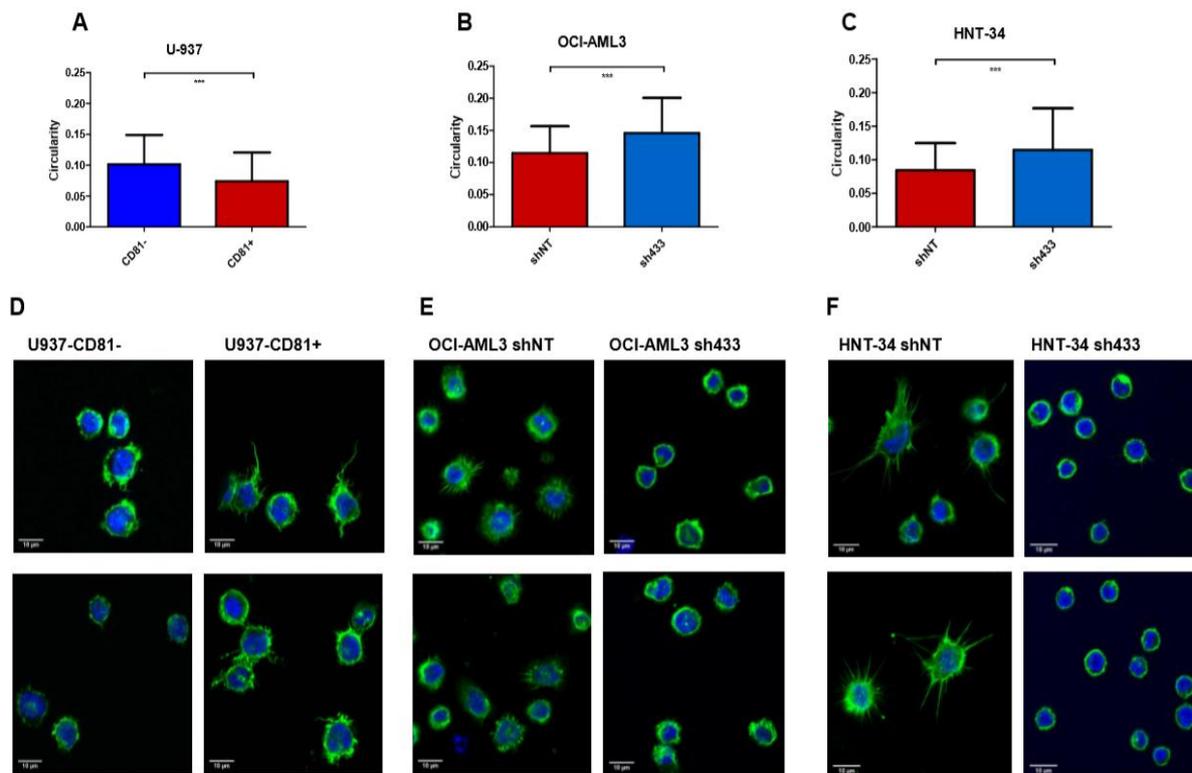


Figure 39 : L'expression de CD81 impacte sur la morphologie cellulaire

Pour la lignée U-937, les cellules CD81+ ont une plus faible circularité (n=3; 434 et 218 cellules analysées, respectivement pour les cellules CD81- et CD81+ ; $p < 0.0001$) (A). Pour les lignées de sous-expression, les cellules shARN 433 CD81 sont plus circulaires (n=2; 295 et 170 cellules analysées, respectivement pour les cellules shNT et sh433; $p < 0.0001$ pour la lignée OCI-AML3 (B) et n=2; 263 et 173 cellules analysées, respectivement pour les cellules shNT et sh433; $p < 0.0001$ pour la lignée HNT-34 (C)). Les photographies représentées de D à F sont des exemples illustrateurs des différences observées.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

IX) Association entre expression de CD81 et prise de greffe :

1. Dans les xénogreffes obtenues avec les lignées modifiées :

L'expression de la luciférase dans nos modèles cellulaires m'a permis de suivre la prise de greffe et l'envahissement leucémique des souris xénogreffées avec les différentes lignées cellulaires.

On observe une prise de greffe plus précoce des cellules CD81+ dans le modèle de surexpression dès J3 et l'envahissement leucémique reste plus important jusqu'à 15 jours de suivi post-injection.

De façon inverse, la prise de greffe est plus lente avec les cellules sh433 du modèle de sous-expression avec une différence statistiquement significative à J10. De même, l'envahissement leucémique est moindre dans les souris lorsqu'elles étaient injectées avec les cellules sh433 jusqu'à 17 jours de suivi post-injection (**Figure 40**).

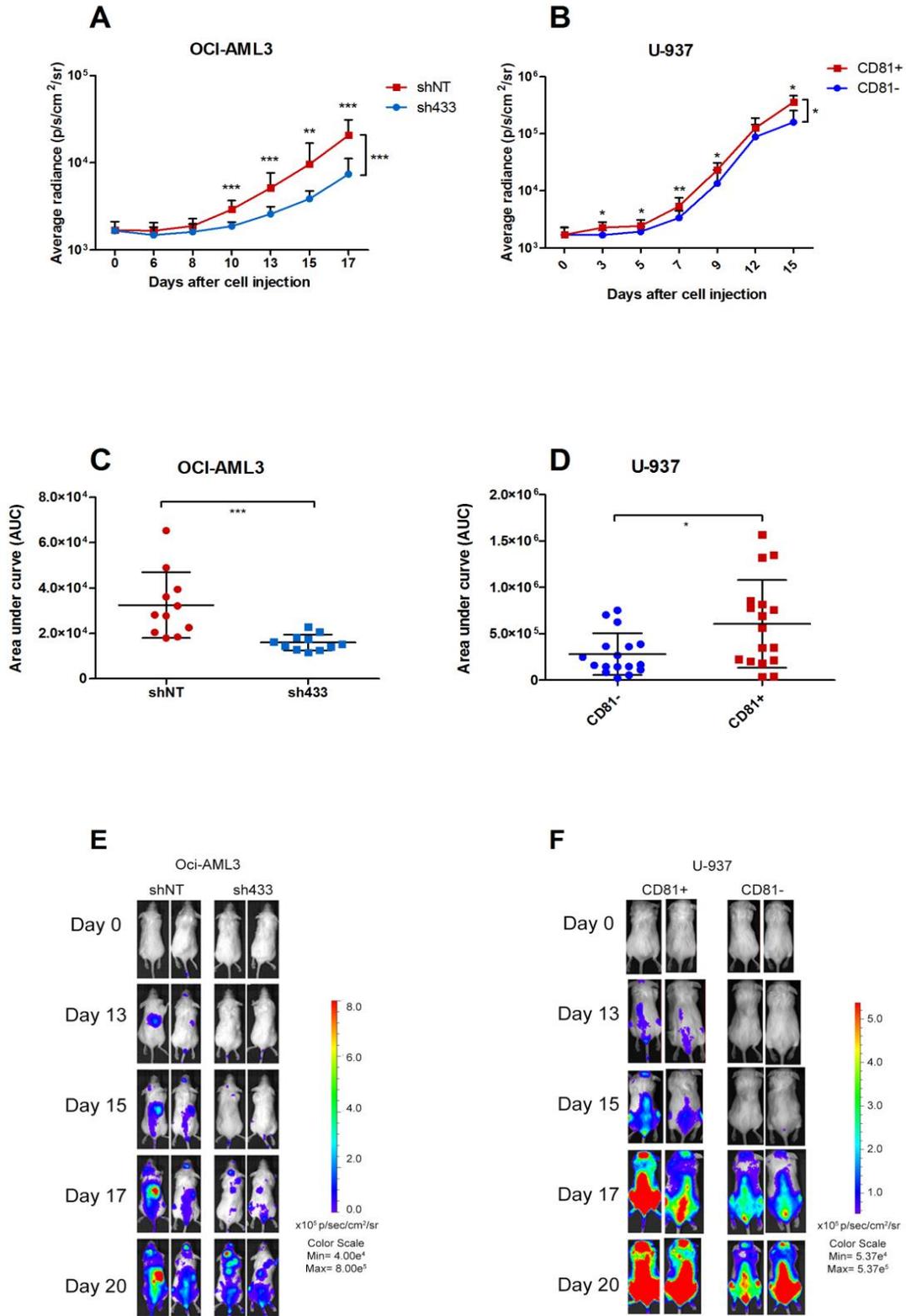


Figure 40 : L'expression de CD81 est liée à une prise de greffe plus précoce
Dans le modèle OCI-AML3, la prise de greffe est plus rapide quand les souris ont été injectées avec les cellules shNT dès J10 (n=11) (A) avec une invasion caractérisée par l'aire sous la courbe (AUC) plus importante chez les souris injectées avec les cellules shNT (n=11 ; $p<0.0006$) (C). Dans le modèle U-937, la prise de greffe est plus rapide lorsque les souris sont injectées avec les cellules CD81+ avec des résultats significatifs dès J3 après l'injection (n=17) (B) ; également l'invasion est significativement plus importante chez ces mêmes souris (n=17 ; $p=0.01$) (D). Ces résultats sont également illustrés par des photographies de souris bioluminescentes à différents temps post-injection (D et F).
* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

2. Dans les xénogreffes obtenues avec les blastes de patients LAM :

Sur les 146 patients prélevés au diagnostic, des PDX ont pu être réalisés pour 68 prélèvements (47%).

Parmi eux, le niveau d'expression de CD81 a pu être défini pour 49 patients : 21 prélèvements ont conduit à une prise de greffe (43%) et 28 n'ont pas donné lieu à une prise de greffe (57%).

L'association entre la prise de greffe et le niveau d'expression de CD81 sur les blastes au diagnostic était significative ($p=0.02$).

On retrouve une corrélation significative entre l'expression de CD81 par les blastes au diagnostic et le délai de prise de greffe ($p=0.007$) (**Figure 41**).

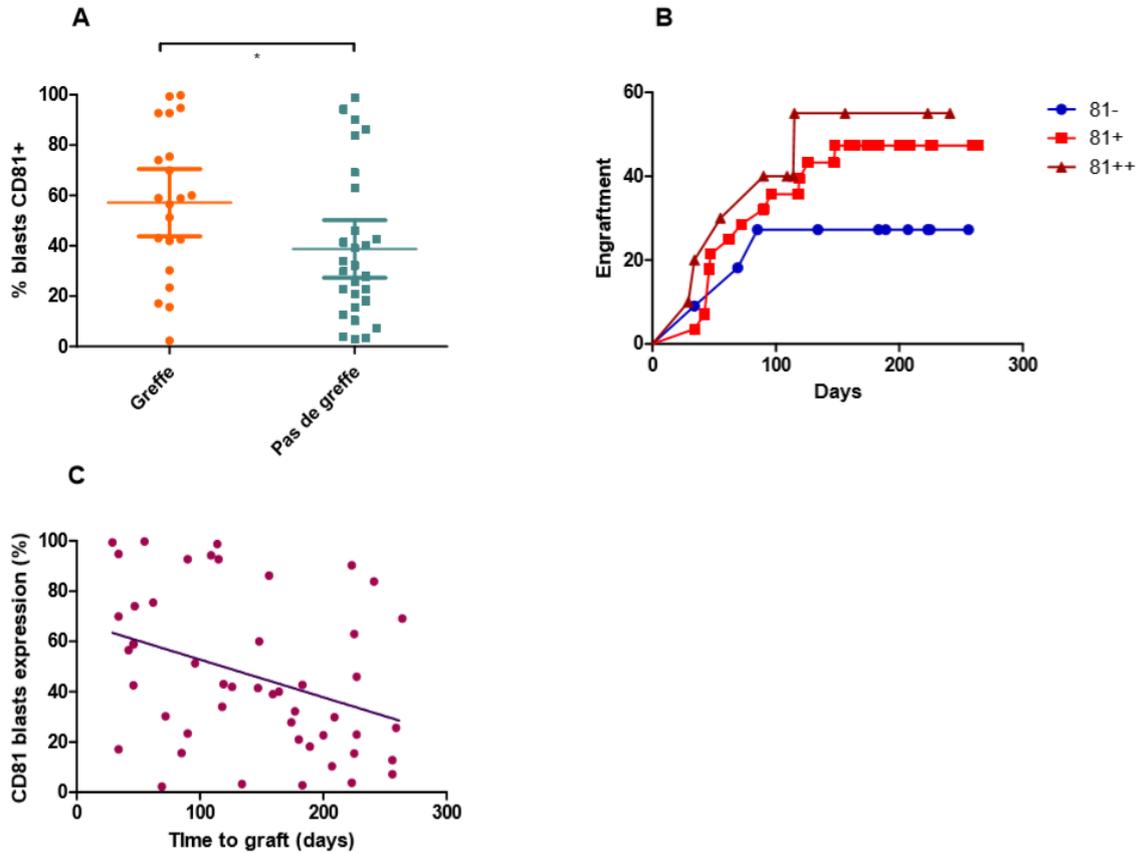


Figure 41 : Prise de greffe des PDX en fonction du pourcentage de blastes CD81+ au diagnostic chez les patients atteints de LAM

La prise de greffe est associée au niveau d'expression de CD81 sur les blastes au diagnostic ($p=0.02$, $n=49$) (A) ; les courbes de prise de greffe en fonction de l'expression de CD81 ne montrent pas de différence significative entre les différents sous-groupes (B). En revanche, l'expression de CD81 sur les blastes au diagnostic est corrélée significativement au délai de prise de greffe ($p=0.007$) ($r=0.38$; IC95= [-0.6 ; -0.1]) ($n=49$) (C).

Expression de CD81 (%) : CD81- <20% ; CD81+ entre 20 et 80% ; CD81++ >80%

* $p<0.05$

X) Association entre expression de CD81 et envahissement

leucémique :

L'envahissement sanguin et médullaire est plus important lorsque les cellules injectées surexpriment le CD81 dans le modèle de surexpression U-937. On observe

les résultats inverses avec les modèles de sous-expression pour l'envahissement splénique et hépatique (**Figure 42**).

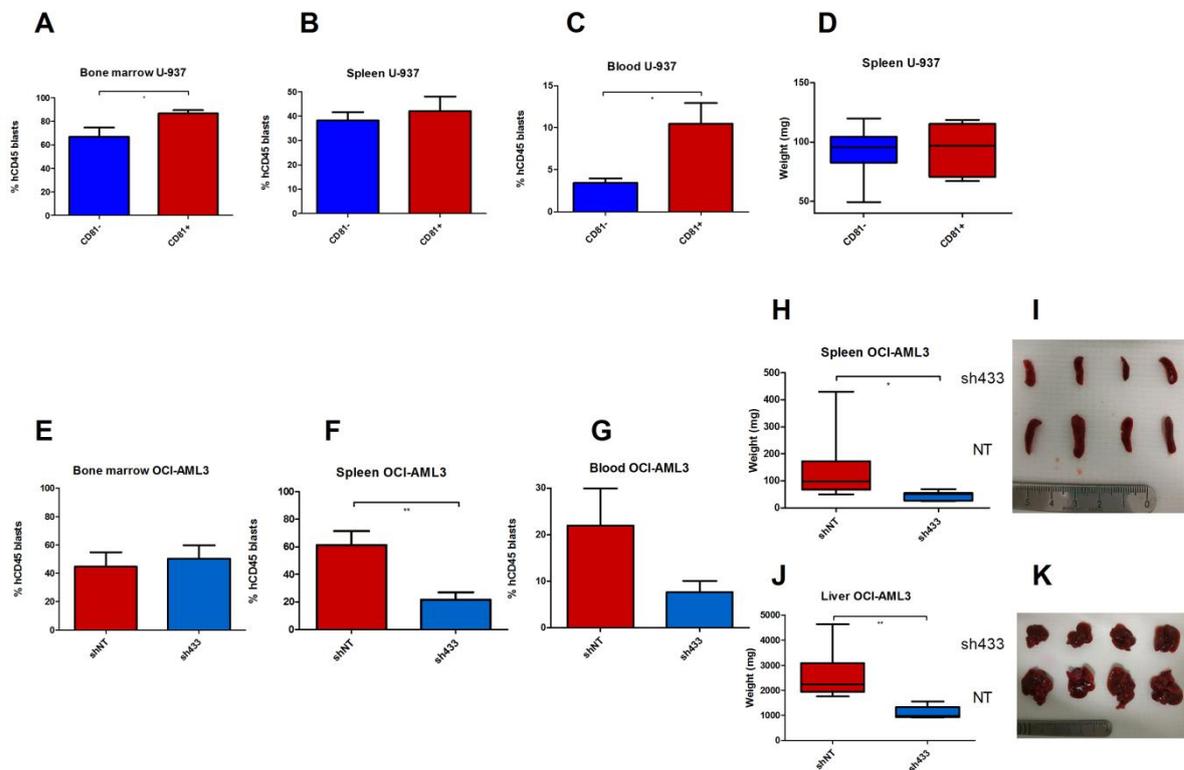


Figure 42 : L'expression de CD81 est liée à l'envahissement tumoral dans les xénogreffes

Lorsque les souris sont injectées avec les cellules modifiées U-937 CD81+, l'envahissement sanguin ($n=7$; $p=0.0109$) (C) et médullaire ($n=10$; $p=0.0394$) (A) est plus important. L'invasion splénique mise en évidence par le % de cellules hCD45 dans la rate (B) et le poids de la rate au sacrifice n'est pas statistiquement différent entre les cellules CD81- et CD81+ (D). Lorsque les souris sont injectées avec les cellules OCI-AML3; l'invasion splénique est plus importante avec les cellules shNT, à la fois en cytométrie en flux ($n=7$; $p=0.005$) (F) et macroscopiquement avec un poids de rate plus important ($n=7$; $p=0.0493$) (H, I). L'invasion hépatique est également plus importante avec les cellules shNT par rapport aux sh433 ($n=7$; $p=0.004$) (J, K). En revanche, il n'y a pas de différence statistiquement significative pour l'envahissement médullaire dans ce modèle ($n=7$) (E); il y a une tendance à un envahissement sanguin plus important mais les résultats n'atteignent pas la significativité ($n=7$, $p=0.11$) (G).

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

Des résultats similaires ont pu être observés grâce à l'étude en immuno-histochimie sur le modèle U-937. Les souris injectées avec les cellules CD81+ ont un

envahissement leucémique très important associé à une infiltration des tissus musculaires adjacents mis en évidence par un marquage CD45 sur des coupes de fémur et de sternum (**Figure 43**).

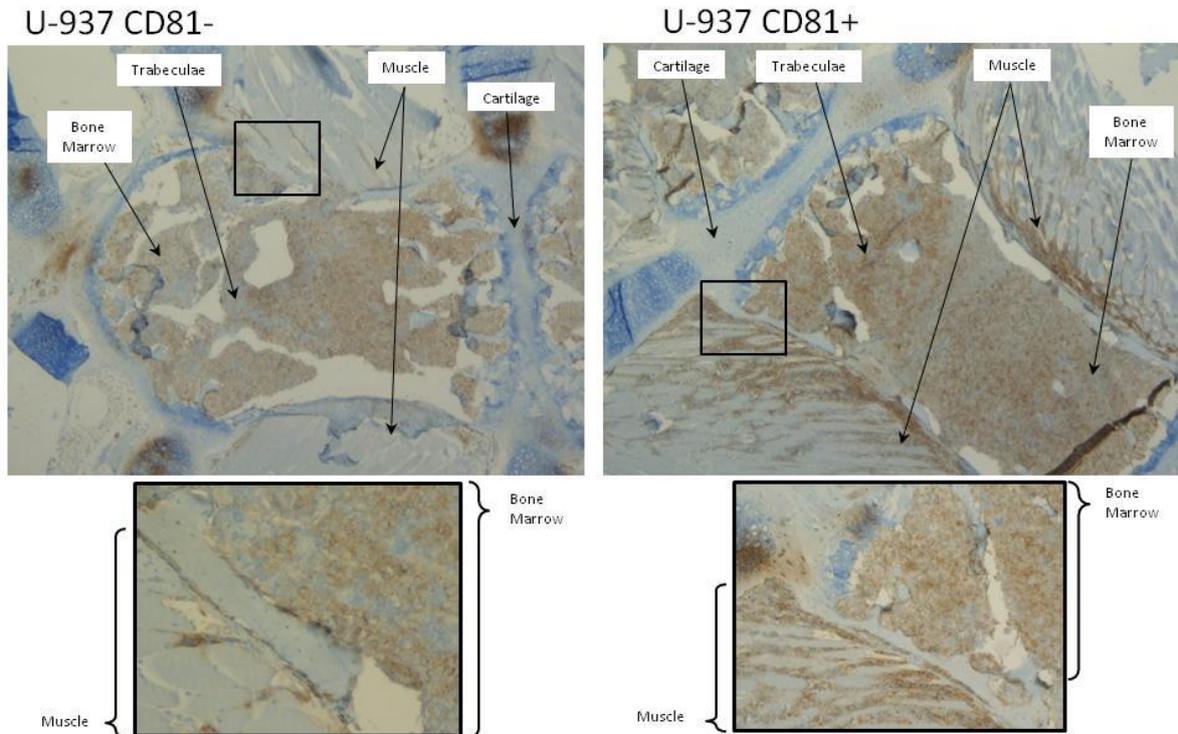


Figure 43 : Etude immunohistochimique de l'envahissement blastique dans le modèle de surexpression U-937

Les blastes humains, marqués grâce à l'anticorps hCD45 (marron), envahissent plus la moelle osseuse et infiltrent les muscles adjacents lorsque les cellules injectées sont CD81+. Contre coloration à l'hématoxyline (bleu).

XI) Etude du homing :

De façon précoce (H16 et H41), je n'ai pas détecté de différence significative en terme de *homing* en fonction du niveau d'expression de CD81, même si on retrouve une tendance avec plus de cellules blastiques au niveau médullaire aux temps précoces dans les cellules surexprimant le CD81. Les coupes histologiques réalisées à ces deux temps ne mettaient pas en évidence de marquage CD45 (**Figure 44**).

A

Homing	U-937 CD81-		U-937 CD81+	
Temps sacrifice	H16	H41	H16	H41
% hCD45 humain dans MO en CMF	0,017	0,027	0,026	0,037

B

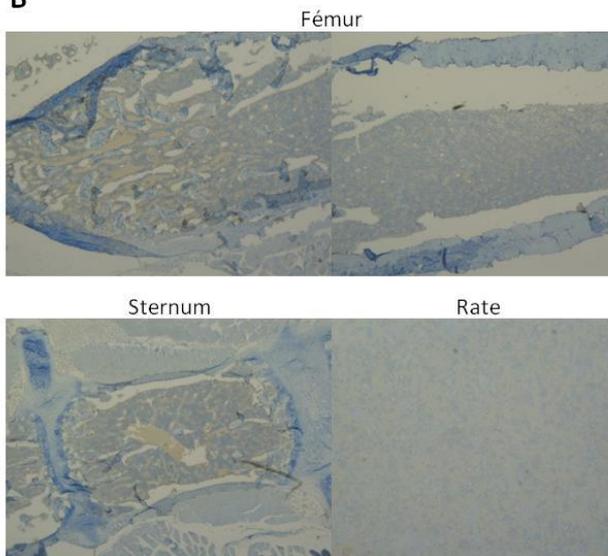


Figure 44 : Etude du homing en fonction de l'expression de CD81 A des temps très précoces (H16 et H41), il semblait y avoir une tendance à un homing plus important lorsque les souris étaient injectées avec les cellules CD81+ en CMF mais ceci n'était pas significatif (A) ; en immunohistochimie, il n'y avait pas de marquage hCD45 visible à ces temps précoces, ne permettant pas l'étude du homing (B).

Contre coloration à l'hématoxyline (bleu).

XII) Effet du blocage des cellules avant xélogreffe par l'anticorps anti-CD81 sur l'envahissement :

Les xélogreffes réalisées à partir de cellules bloquées par l'anticorps CD81 BD montrent un moindre envahissement des organes hématopoïétiques par rapport aux cellules traitées avec l'isotype contrôle, à la fois au niveau sanguin, médullaire et splénique (**Figure 45**). Ces résultats sont reproductibles avec les deux anticorps utilisés (données montrées seulement avec l'anticorps BD).

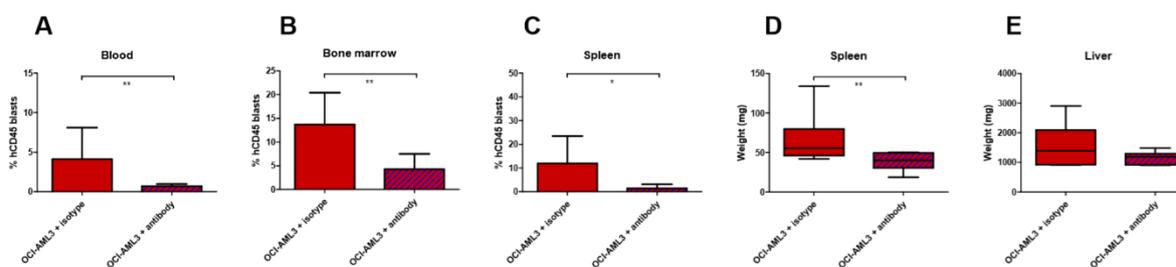


Figure 45 : Effet du blocage par anticorps anti-CD81 sur les cellules avant xénogreffes dans des souris immunodéficientes

Le blocage des cellules OCI-AML par l'anticorps anti-CD81 par rapport à l'isotype contrôle diminue l'envahissement sanguin ($p=0.004$; $n=7$) (A), médullaire ($p=0.002$; $n=11$) (B), splénique ($p=0.01$; $n=9$) (C) et ($p=0.008$; $n=10$) (D) après injection dans des souris NSG. Il n'y a pas d'effet significatif sur l'envahissement hépatique (E).

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

XIII) Impact de l'expression du CD81 sur la sécrétion des exosomes :

L'expression de CD81 sur les lignées cellulaires est corrélée à une quantité d'exosomes sécrétés plus importante dans le modèle de surexpression et un des deux modèles de sous-expression (**Figure 46**).

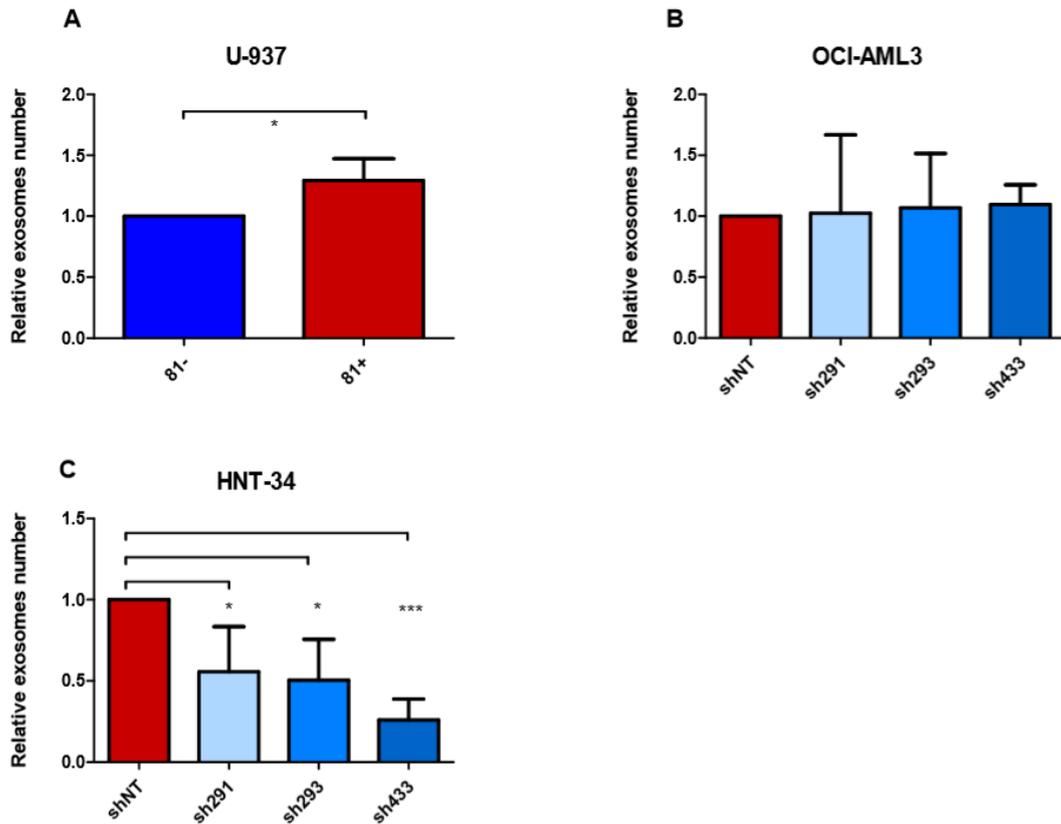


Figure 46 : L'expression de CD81 est associée à une sécrétion d'exosomes plus importante.

La sécrétion d'exosomes est plus importante dans les cellules CD81+ de la lignée U-937 ($p=0.01$; $n=4$) (A) et dans les cellules shNT de la lignée HNT-34 ($p=0.007$, $p=0.002$ et $p<0.0001$ par rapport respectivement aux cellules sh291, 293 et 433 ; $n=5$) (C). En revanche, les résultats ne sont pas significatifs pour la lignée OCI-AML3 ($n=4$) (B).

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

Discussion

I) Etude d'ABCB1 dans la LAM :

En première partie, nous avons démontré l'impact pronostique de l'expression génique, protéique et de l'activité d'ABCB1. Il semble qu'ABCB1 ne soit pas directement impliqué dans la chimiorésistance puisque l'activité ABCB1 n'aboutit pas directement à une chimiorésistance aux anthracyclines *ex-vivo*. La corrélation entre l'expression d'*ABCB1* et celle des gènes de *BAALC*, *CD34*, *CD200* et *CD7*, suggère que l'expression d'*ABCB1* soit un indicateur indirect des LAM de haut risque. Nous avons également montré que les patients avec faible expression d'ABCB1 pourraient bénéficier d'un traitement anti-CD33 par gemtuzumab ozogamicin associé à la chimiothérapie conventionnelle.

1. Association ABCB1 et survie : par quels mécanismes ?

Dans notre étude, une forte expression et activité d'ABCB1 ont été mises en évidence à la fois par un test fonctionnel spécifique utilisant la rhodamine 123 et le Vérapamil et par l'expression de l'ARNm d'ABCB1. Cette expression et activité sont associées à un moins bon pronostic chez les patients atteints de LAM. D'autres études avaient déjà retrouvé cette association (181,182). Le mécanisme hypothétique de cette association semblait être une augmentation de la chimiorésistance des blastes par phénomène MDR, activité intrinsèque à ABCB1 préalablement décrite (48,183).

Contrairement à une autre équipe (182), nous avons montré qu'une forte activité d'ABCB1 est associée à une absence de mutation *NPM1* ou réarrangement *FLT3-ITD* et que sa valeur pronostique est indépendante de la classification ELN ; cela en fait un marqueur pronostique très intéressant, notamment pour les patients du groupe intermédiaire.

Cependant, dans notre étude, l'impact le plus fort est surtout sur la survie à long terme, comme l'illustre les courbes de survie globale (OS) et survie sans événement (EFS), alors que la survie à court et moyen termes, représentée par les courbes de rémission complète (CR) et survie sans rechute (DFS) est peu impactée.

De façon liée, l'activité médiane d'ABCB1 n'est pas significativement augmentée chez les patients en échec d'induction par chimiothérapie; de même, le taux de rechute n'est pas supérieur chez les patients avec une forte activité ABCB1. Ceci montre que l'impact pronostique d'ABCB1 n'est pas uniquement lié à son effet sur la chimiorésistance.

Pour corroborer ce résultat, nos tests de chimiosensibilité n'ont d'ailleurs pas montré d'association entre la chimiorésistance aux anthracyclines (Daunorubicine et Idarubicine) et une forte activité d'ABCB1.

Afin de déterminer par quels mécanismes ABCB1 a un impact sur le pronostic nous avons identifié les gènes fortement exprimés lorsque l'activité d'ABCB1 était forte. Parmi eux, les gènes *CD200* et *BAALC* étaient retrouvés.

D'autres études ont également montré une association entre l'expression de ces gènes et un mauvais pronostic dans les LAM (184–188). Une des pistes mécanistiques intéressantes concernant le gène *CD200* serait son action immunorégulatrice sur les cellules NK pouvant conduire à un phénotype de chimiorésistance des blastes.

En résumé, ABCB1 pourrait n'être qu'un marqueur indirect de mauvais pronostic dans les LAM en modifiant l'expression de certains gènes.

2. Quelles cibles pour ABCB1 ?

Plusieurs inhibiteurs d'ABCB1 de première génération ont déjà été testés (vérapamil, quinine, ciclosporine A) ; malgré des effets prometteurs dans les phases pré-cliniques, les essais cliniques n'ont pas mis en évidence de bénéfice à cause d'effets *off-target* importants dûs à la nécessité de traiter les patients avec des doses de médicaments très fortes (189).

Dans notre étude, un traitement adjuvant par la quinine (inhibiteur d'ABCB1) n'a pas permis d'augmenter la survie globale, ce qui avait déjà été montré dans deux essais cliniques de phase III (59,60). Nous avons également relevé plusieurs effets

secondaires, en lien avec des effets *off-target* (nausées, vomissements, accouphènes, diarrhées, mucite). Le rapport bénéfice/risque n'est donc pas en faveur de l'utilisation de ce médicament comme traitement adjuvant dans les LAM.

Les résultats obtenus avec les inhibiteurs de seconde génération (Valspodar, PSC833 et Biricodar, VX-710) sont similaires, la balance bénéfice-risque étant défavorable. Actuellement, des essais de phases I/II utilisant des inhibiteurs de troisième génération en association à la chimiothérapie conventionnelle sont en cours (190,191).

Notre analyse transcriptomique a permis d'établir une corrélation inverse entre le niveau d'expression de CD33 et celui d'ABCB1 ; ceci avait déjà été montré par l'équipe de Walter *et al* (55). Le CD33, exprimé à la surface des progéniteurs myéloïdes, est la cible thérapeutique de gemtuzumab ozogamicin (GO) (Mylotarg®). Ainsi, nous avons montré un effet bénéfique du traitement par GO sur l'EFS et la DFS chez des patients ayant un faible niveau d'expression d'ABCB1. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui décrivent également une association significative entre une forte expression d'ABCB1 et une faible réponse au GO (192). Cependant, à ce jour, il n'y a aucune étude publiée sur un potentiel effet d'efflux du transporteur ABCB1 sur GO.

Selon nos résultats, évaluer le niveau d'expression d'ABCB1 au diagnostic, en plus d'être un marqueur pronostique, pourrait être un bon indicateur de la réponse thérapeutique à GO.

3. ABCB1 : marqueur de CSL ?

Dans notre étude, l'analyse phénotypique de CD34 et CD38 a révélé qu'il n'y avait pas de différence d'expression d'ABCB1 entre la population CD34+CD38- et la population des blastes totaux. Il semblerait donc qu'ABCB1 ne soit pas un marqueur spécifique de CSL. Ceci est soutenu par nos tests de chimiosensibilité qui ne retrouvent pas de phénotype MDR associé à l'expression d'ABCB1.

De plus, une étude antérieure, menée par notre équipe avait montré que l'activité d'ABCB1 n'était pas associée à la signature LSC17 (33).

Cependant, cette hypothèse ne pourra être affirmée qu'après avoir réalisé des tests fonctionnels chez des souris immunodéficientes.

Malgré tout, l'étude de ce transporteur reste importante pour la prise en charge thérapeutique des patients.

II) Etude de CD81 dans les LAM :

L'objectif de la deuxième partie de ce travail était de comprendre les mécanismes impliqués dans l'association entre une forte expression de CD81 et un moins bon pronostic chez les patients atteints de LAM (176).

Pour ce faire, j'ai d'abord utilisé des modèles cellulaires afin d'étudier les grandes fonctions cellulaires *in vitro* puis *in vivo*.

J'ai montré qu'une forte expression de CD81 induisait *in vitro* une plus forte 1) adhésion à la fibronectine et aux fibroblastes, 2) migration et 3) invasion tumorale dans une matrice de gel semi-liquide.

De plus, j'ai mis en évidence en microscopie confocale, que les cellules exprimant plus le CD81 avaient plus de lamellipodes, impliqués dans la migration cellulaire.

Des tests de chimiorésistance ont révélé une corrélation entre une forte expression de CD81 et une résistance à la daunorubicine, chimiothérapie utilisée dans le traitement des LAM.

La quantification des exosomes sécrétés par les lignées a mis en évidence une association positive entre l'expression de CD81 et une plus forte sécrétion d'exosomes.

Nous avons également démontré par utilisation de xénogreffes de lignées cellulaires modifiées une augmentation de l'invasion tumorale lorsque le CD81 était surexprimé ; et ce dès les premiers jours après injection des cellules.

Enfin, grâce à des PDX de LAM, j'ai démontré une association entre l'expression de CD81 sur les blastes au diagnostic et une prise de greffe chez les souris NSG avec une corrélation entre le temps de prise de greffe et l'expression de CD81, suggérant qu'il pourrait être un marqueur de cellules souches.

1. Discussion des modèles investis :

a) Utilisation d'anticorps bloquants : atouts et limites :

Dans un premier temps, j'ai utilisé des anticorps bloquants le CD81 pour pré-traiter les cellules qui expriment le CD81 à l'état basal afin de définir s'il y avait un effet du blocage de cette protéine. L'utilisation d'anticorps bloquants m'a permis de commencer rapidement mes expériences car ceux-ci étaient disponibles au laboratoire et faciles d'utilisation avec des protocoles de traitement décrits par les fabricants, même si le temps de blocage restait un paramètre non déterminé pour nos lignées cellulaires.

Les résultats obtenus avec les expériences réalisées *in vivo* avec les anticorps bloquants ont été confirmés par les résultats obtenus ultérieurement avec les lignées modifiées (**Figure 45 et Figure 42**). De même, les tests de chimiosensibilité avec anticorps bloquants montrent une plus grande chimiosensibilité aux drogues après blocage (**Figure 30**) sur les lignées exprimant à l'état basal le CD81, ce qui encore une fois a été vérifié avec les lignées modifiées.

Cependant, sur la lignée de surexpression U-937, toutes les tentatives de blocage des cellules CD81+ se sont révélées infructueuses dans les tests réalisés *in vitro*. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les cellules U-937 modifiées expriment très fortement le CD81 (**Figure 28**) avec un *fold change* en qPCR de l'ordre de 4000 entre les cellules CD81+ et CD81- *versus* 5 à 2.5 entre les cellules shNT et shCD81 dans le modèle de sous expression.

Ces anticorps ont en premier lieu été mis au point par des équipes de recherche en virologie et ont été testés *in vitro* sur des lignées cellulaires d'hépatocytes ou *in vivo* dans des modèles murins d'hépatocarcinomes (193,194). En hématologie, ils ont montré un effet anti-prolifératif sur les lymphocytes B (68,71).

Récemment, un anticorps anti-CD81 (clone 5A6), reconnaissant un épitope différent de ceux que nous avons utilisé, a été montré comme étant efficace pour limiter la prolifération tumorale dans un modèle murin de lymphome B. Cette équipe avait également testé les deux anticorps que nous utilisons mais n'avait pas trouvé d'efficacité de ceux-ci (154).

Pour notre étude, ne connaissant pas la fonction précise du CD81, nous n'avons eu aucun moyen de vérifier que nos anticorps aient bien une action « bloquante » sur nos cellules. En effet, on sait que certains anticorps bloquants peuvent se comporter soit comme des agonistes, soit comme des antagonistes des molécules auxquelles ils se fixent (86) ou bien avoir des effets *off-target*.

L'utilisation d'anticorps bloquants pourrait être une piste intéressante, en particulier avec la réalisation de tests de traitement *in vivo* mais il serait nécessaire d'approfondir les connaissances sur leurs modes d'action avant cette utilisation.

b) Modèle *in vivo* : souris NSG :

Notre modèle *in vivo* utilise des souris NSG (NOD/SCID/IL-2R γ ^{null}). Ce modèle est utilisé pour les xélogreffes de cellules de LAM par plusieurs équipes avec de bons résultats de prise de greffe (195,196). Une des particularités de notre protocole dans l'équipe est l'absence d'irradiation des souris en conditionnement pré-greffe dans le but de préserver la niche hématopoïétique et l'environnement tumoral. Ainsi, la leucémogénèse à la prise de greffe est plus proche de la leucémogénèse humaine, ce qui est important lorsque l'on s'intéresse au phénomène de *homing* notamment. En ce sens, notre modèle semble être un bon modèle d'étude.

Cependant, l'absence d'immunité de l'hôte implique une absence d'immunité anti-tumorale. Or, si l'expression du CD81 confère des propriétés de défense contre l'immunité anti-tumorale (quiescence, migration vers la niche hématopoïétique) les différences observées chez les souris greffées seraient moins importantes que celles prévisibles chez l'Homme. D'ailleurs, les récents travaux de l'équipe de Vences-Catalan sur l'efficacité de l'anticorps anti-CD81 dans un modèle de souris Beige-SCID ont montré que l'action de l'anticorps faisait intervenir la voie du complément, les macrophages et les lymphocytes NK (154). En cela, ce modèle murin n'est pas adapté pour étudier l'effet de l'anticorps anti-CD81.

De plus, l'utilisation d'anticorps bloquants le CD81 humain chez les souris non humanisées ciblerait uniquement les cellules leucémiques humaines injectées ; ce qui ne serait pas le cas chez l'Homme où l'anticorps se fixerait sur toutes les cellules sanguines exprimant le C81, dont les lymphocytes B pouvant induire de potentiels effets indésirables.

2. Etude des mécanismes potentiellement impliqués dans le rôle de CD81 au cours de la leucémogénèse des LAM :

a) Effet de CD81 sur la chimiorésistance :

Pour expliquer l'impact pronostique du CD81, j'ai d'abord étudié l'association entre l'expression de cette protéine et la sensibilité aux chimiothérapies utilisées dans les LAM en réalisant des tests MTS. En effet, dans notre cohorte de patients, l'expression de CD81 impactait plus la survie sans rechutes (RFS) que la survie globale (OS) (176) (**Figure 21**) pouvant indiquer une implication du CD81 dans la chimiorésistance. Mon travail a mis en évidence *in vitro* une association entre la surexpression du CD81 et une augmentation de la chimiorésistance aux anthracyclines, notamment à la daunorubicine (**Figure 30**).

Pour essayer de mieux comprendre ce phénomène, nous avons retenu deux pistes :
1/ Les cellules leucémiques CD81+ seraient quiescentes et donc moins exposées à l'action des chimiothérapies (37,197) ; ce qui irait dans le sens de notre hypothèse de départ conférant au CD81 des propriétés souches.

2/ Leur adhésion aux cellules stromales les protégerait de l'apoptose chimio-induite par la libération de facteurs anti-apoptotiques, tels que le Very-late Antigen (VLA)-4 (198). En ce sens, l'équipe de Carloni *et al.*, a montré dans un modèle de cancer colorectal métastatique une association entre chimiorésistance et fusion cellulaire (fusion de deux cellules par leurs membranes plasmiques aboutissant à une cellule bi- ou multinuclée) facilitée par le complexe CD9-CD81-ADAM10 (199). Quagliano *et al.* rapporte également une diminution de 60% de résistance à l'Aracytine *ex vivo* dans des lignées de leucémies aiguës lymphoblastiques CD81KO en lien avec une diminution d'adhésion de ces cellules (data non publiées ayant fait l'objet d'abstracts à l'ASH en 2018 et 2019 ; (200,201)).

Pour étayer ces deux hypothèses, j'ai réalisé une étude de la prolifération et du cycle cellulaire et des tests d'adhésion avec nos modèles cellulaires.

De surcroît ; ces deux pistes impliquant un rôle de la niche hématopoïétique, j'ai refait les tests de chimiosensibilité en co-culture avec des fibroblastes HS-5 pour voir si l'effet était augmenté, ce qui n'était pas le cas. Cependant, la co-culture avec des

fibroblastes est un modèle très imparfait de la niche hématopoïétique. Nous envisageons de refaire ces tests en co-culture avec des ostéoblastes en mono ou bicouche comme cela a été fait par l'équipe de Quagliano (202) ou *in vivo* en traitant les PDX par anthracyclines.

b) Effet de CD81 sur la prolifération

La première description de CD81 en 1990 repose sur l'identification d'un anticorps monoclonal murin capable d'induire un effet anti-prolifératif sur les cellules exprimant cette protéine, d'où son appellation synonyme de TAPA-1 (Target of an AntiProliferative Antibody) (68).

Outre l'explication possible des résultats de chimiosensibilité, il est possible que le CD81 entraîne une plus grande prolifération augmentant l'envahissement leucémique dans la LAM, je me suis donc intéressée à cette fonction cellulaire.

Mes résultats *in vitro* sur les lignées cellulaires modifiées montrent que l'expression de CD81 n'a aucune influence sur la prolifération cellulaire (**Figure 31**). N'ayant aucun moyen de m'assurer de l'effet des anticorps bloquants à moyen terme, je n'ai pas testé l'effet de l'utilisation d'anticorps bloquants anti-CD81 sur la prolifération cellulaire.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

1/ Dans l'étude d'Oren *et al.* ; les résultats concernaient essentiellement des lignées cellulaires lymphoïdes (Oci-Ly8, Su-DHL-4). Or, la protéine CD81 est très fortement exprimée par les lymphocytes B. Sur les lignées cellulaires de LAM, exprimant le C81 de façon plus modérée, la prolifération était modérément inhibée par l'anticorps (14% pour la lignée KG1) voire sans effet pour les lignées K562 et HL-60. Les effets sur la prolifération pourraient donc dépendre du type cellulaire.

2/ Une autre explication pourrait être la nécessité d'un stimulus pour déclencher la prolifération cellulaire.

En effet, l'équipe du Dr Lagaudrière-Gesbert *et al.* a montré que les anticorps anti-CD81 (mais également les anticorps anti-CD9, CD53 et CD82) inhibaient la prolifération cellulaire dans un modèle cellulaire lymphoïde T *in vitro* (cellules Jurkat) *via* la production d'Interleukine 2 (127) avec pour l'anticorps anti-CD81 une diminution de prolifération de 70 à 80%. Egalement, l'équipe du Docteur Campbell a retrouvé

que le CD81 agissait comme un médiateur positif ou négatif sur la prolifération des lymphocytes B selon le type de stimulus et le partenaire impliqué (203).

En cela, l'utilisation de lignées n'est pas le meilleur modèle pour tester la prolifération cellulaire car elle s'affranchit de l'environnement cellulaire naturel et d'éventuels stimuli. Il pourrait être intéressant de réaliser des expériences de cycle cellulaire sur des blastes de patients avant et après chimiothérapie afin d'observer si celle-ci entraîne une activation de la prolifération sur les cellules exprimant le CD81 ; ces expériences devront être couplées à des tests d'apoptose pour dégager l'effet apoptotique des drogues.

Mes manipulations de cycle cellulaire n'ont pas permis d'établir une différence en terme de répartition dans le cycle cellulaire entre les cellules CD81+ versus CD81-, ni lorsque les cellules sont bloquées par les anticorps bloquants.

De la même manière, ces expériences ne prenaient pas en compte l'environnement médullaire, pour s'assurer de l'absence d'effet, on pourrait réaliser ces expériences sur des prélèvements au sacrifice des souris injectées avec les cellules exprimant différemment le CD81, lignées ou PDX.

c) Effet de CD81 sur l'adhésion :

L'adhésion cellulaire est la première étape au processus de *homing* qui permettrait aux blastes d'échapper à l'action des chimiothérapies (204,205).

Dans mon travail, j'ai retrouvé une association entre l'expression de CD81 et une augmentation de l'adhésion cellulaire, à la fois à la fibronectine mais également aux fibroblastes (**Figure 32 et Figure 34**). Ceci avait déjà été rapporté par d'autres études pour d'autres tétraspanines (87,88). En particulier, dans un modèle de LAM murin, il a été montré que la tétraspanine CD82 augmentait l'adhésion cellulaire *via* la réorganisation de la N-cadherin (206). Les mécanismes en jeu ne sont pas tous décrits, mais il y a de fortes preuves pour penser que ce rôle soit médié par les intégrines, auxquelles se lient les tétraspanines (**Tableau II**).

Plusieurs études vont dans ce sens : l'équipe de Zhang F *et al.* notamment, a montré que la tétraspanine CD151, par le complexe CD151-intégrine $\alpha 3\beta 1$ activait Rac1, ce qui aboutissait à la formation de lamellipodes qui concourent à augmenter l'adhésion des cellules endothéliales (207). L'équipe de Behr et Schriever a trouvé que le CD19

et le CD81 avaient un rôle dans l'adhésion des lymphocytes B au stroma lymphoïde *in situ* en régulant l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (208) ; et une autre étude a montré une colocalisation entre CD81 et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ à l'aide de la microscopie confocale.

Tout ceci converge vers l'hypothèse d'un partenaire de CD81, au sein du réseau tétraspanine, conduisant à augmenter l'adhésion cellulaire. Au vu de la littérature, l'hypothèse d'une intégrine comme partenaire paraissait judicieuse. Je me suis donc intéressée aux laminines, lesquelles se lient préférentiellement à certaines intégrines, espérant retrouver une adhésion plus forte des cellules CD81+ envers un sous-type de laminine spécifique.

Les tests d'adhésion avec les laminines ne se sont pas avérés concluants avec de grands écarts-types entre les différentes manipulations et aucune laminine n'est apparue comme étant le ligand préférentiel des cellules CD81+ dans les deux modèles testés (**Figure 35**).

d) Effets de CD81 sur la migration et l'invasion cellulaires :

Mes tests de migration et d'invasion cellulaires ont permis de trouver une association positive entre l'expression de CD81 et une augmentation de la migration et de l'invasion cellulaires vers les cellules stromales (**Figure 36 et Figure 37**). Cette notion avait déjà été décrite dans la littérature.

De fait, un effet anti-migratoire et pro-agrégant avait déjà été attribué *in vitro* aux anticorps anti-CD81 sur des lignées cellulaires de leucémie aiguë lymphoïde (Nalm6 et HEL) (127).

Egalement, dans un modèle de mélanome, une surexpression de CD81 a été montrée comme étant significativement associée à une augmentation de la migration et de l'invasion des cellules tumorales aboutissant à un plus fort potentiel métastatique en induisant l'expression de la *membrane type 1 matrix metalloproteinase* (MT1-MMP) via la voie de signalisation Akt-dépendent Sp1 (140). Dans un autre modèle de mélanome, il a été montré que CD81 et CD9 régulaient les récepteurs de TGF- β (1 et 2) ce qui augmentait l'invasion, la transition épithélio-mésenchymateuse et les métastases (209).

Il semble donc que l'effet de CD81 sur la leucémogénèse des LAM soit lié d'une part à une plus grande chimiorésistance des cellules CD81+ et d'autre part à une

augmentation des capacités d'adhésion-migration et invasion de ces mêmes cellules, ces deux effets pouvant être liés.

La problématique était alors de comprendre par quels mécanismes les cellules exprimant plus fortement le CD81 pouvaient acquérir de telles propriétés.

En immunologie, le CD81 a un rôle essentiel dans la migration des cellules dendritiques et l'équipe de Quast *et al.* a expliqué cela par la formation de lamellipodes *via* l'activation de Rac1 (76) (**Figure 10**).

Partant de ce constat, je me suis intéressée à la morphologie cellulaire, ce d'autant que j'avais déjà repéré en microscopie photonique une variation de diamètre des cellules en fonction de l'expression de CD81.

3. Modification du cytosquelette membranaire :

L'étude de la morphologie cellulaire de mes différents modèles a révélé que les cellules CD81+ étaient à la fois plus petites, mais surtout moins circulaires que les cellules CD81-. Par microscopie confocale, j'ai pu observer, grâce à un marquage à la phalloïdine, que les cellules CD81+ avaient des extensions membranaires à leur surface (**Figure 38 et Figure 39**). Physiologiquement, la phalloïdine est une protéine qui se fixe et stabilise les microfilaments d'actine au niveau du cytosquelette cellulaire. Celle-ci est utilisée en microscopie pour marquer l'actine polymérisée et permet donc de visualiser le cytosquelette (210).

D'autres équipes rapportent un effet de l'expression de CD81 sur les modifications du cytosquelette et il a déjà été montré que cette protéine pouvait entraîner la formation de protrusions membranaires (parfois aussi appelées lamellipodes), notamment sur les cellules dendritiques *via* l'activation de Rac1 (76), dans les lymphocytes B *via* la phosphorylation de la kinase Syk qui entraîne l'activation de la protéine ezrin (211), dans les lymphocytes T et NK *via* la voie MAPK-ERK (212) et dans les cellules neurales *via* la voie de signalisation PI3K-AKT (213).

4. Effets de l'augmentation des capacités d'adhésion et de migration *in vivo* :

In vivo, mes résultats montrent une association entre l'expression du CD81 et l'envahissement tumoral (**Figure 42 et Figure 43**).

Dans la littérature, plusieurs modèles murins de xénogreffes montrent que les tétraspanines (dont le CD81), contribuent à la progression tumorale (86) (139,140). L'augmentation des capacités d'invasion et de migration des cellules CD81+ pourrait en être la cause.

En revanche, nous ne connaissons pas les répercussions de l'augmentation des capacités d'adhésion induites par le CD81; cela nous a conduit à étudier le phénomène de *homing*, d'autant plus qu'il existait une meilleure prise de greffe chez les PDX en lien avec l'expression de CD81.

Le *homing*, défini par la capacité des cellules sanguines à retourner dans la moelle osseuse, constitue le *primum movens* de la greffe de CSH (18).

Cette piste était étayé par les travaux sur les greffes de sang placentaires montrant l'implication d'une autre tétraspanine, le CD9, dans le *homing* (128).

Mes premières expériences de *homing* n'ont pas permis de montrer de différence en fonction de l'expression de CD81 à des temps très précoces (**Figure 44**).

De plus, l'étude du *homing* par cytométrie de flux est difficile puisque la proportion attendue de cellules leucémiques à un temps précoce après la greffe est faible et il est impossible de s'affranchir d'une contamination sanguine, la moelle osseuse étant richement vascularisée. Un des moyens de contourner cette limite est de réaliser des immunomarquages sur les coupes de fémur et de sternum de souris xénogreffées. Cela permet de localiser les cellules marquées dans la moelle osseuse et de s'assurer qu'il ne s'agit pas de cellules sanguines. Cette technique a également l'avantage de pouvoir étudier les cellules présentes dans la partie distale des os connue pour contenir les niches hématopoïétiques. Cependant, l'étude des coupes marquées n'a pas permis de mettre en évidence de cellules positives (**Figure 44**).

En revanche, le suivi en bioluminescence des souris injectées avec les différents modèles cellulaires a permis de montrer un envahissement leucémique dépendant de l'expression de CD81, et ce, de façon très précoce (dès le 3^{ème} jour post-injection pour le modèle de surexpression) (**Figure 40**).

Ceci a été confirmé par la réalisation de PDX à partir de moelle osseuse de patients atteints de LAM. Ces expériences montrent une différence de prise de greffe en fonction de l'expression de CD81 sur les blastes de patients et une corrélation entre le délai de prise de greffe et cette même expression (***Figure 41***).

Ces résultats doivent tout de même être nuancés car le suivi des lignées cellulaires par bioluminescence ne permet pas de localiser précisément les cellules injectées ; or, le phénomène de *homing* implique que les cellules leucémiques se trouvent dans la moelle osseuse. Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'effet potentiel du CD81 dans le *homing*. Pour cela, nous pourrions renouveler les immunomarquages sur des coupes sériées de moelle osseuse afin d'augmenter le nombre de cellules analysées et de s'affranchir de l'effet d'échantillonnage ou utiliser de la microscopie à feuillets de lumière après transparençisation tissulaire ce qui nous permettrait d'étudier la totalité du volume osseux.

Les données obtenues sur les PDX pourraient indiquer que la protéine CD81 est un marqueur souche. Cependant, dans notre cohorte, il y a des prélèvements pour lesquels l'expression de CD81 était très faible – voire nulle – et pour lesquels la xénogreffe a entraîné une leucémogénèse chez la souris.

Afin d'aller plus loin dans cette hypothèse, il serait judicieux de regarder les autres marqueurs de CSL sur les patients pour lesquels les PDX ont abouti, notamment l'association CD34+CD38-.

5. Association entre l'expression de CD81 et la sécrétion d'exosomes :

Dans mon travail, j'ai démontré qu'une plus forte expression de CD81 dans les lignées cellulaires modifiées était associée à une sécrétion augmentée d'exosomes (***Figure 46***). Or, les exosomes ont la capacité de modifier l'environnement tumoral, et peuvent le rendre plus favorable à la survie des cellules leucémiques.

Plusieurs études ont rapporté un rôle des exosomes sécrétés par les blastes de patients atteints de LAM sur la chimiorésistance (165,167,214,215). De façon corrélée, l'équipe de Hong *et al.* a montré que la quantité d'exosomes sécrétés par les blastes myéloïdes pouvait être un bon indicateur de la réponse au traitement par

chimiothérapie (175). Ces mécanismes de chimiorésistance ne sont pas encore complètement élucidés mais semblent impliquer pour la plupart le rôle cargo des exosomes ; le contenu des exosomes pourrait permettre aux blastes d'acquérir un phénotype résistant à l'apoptose ou quiescent, ou encore des capacités d'adhésion augmentées. Bebawy *et al.* ont démontré que les exosomes permettaient le transfert *in-vitro* du transporteur ABCB1 de cellules chimiosensibles à des cellules chimiorésistantes (216).

Cette notion pourrait expliquer que nous n'ayons pas retrouvé d'effet d'ABCB1 sur la chimiorésistance avec nos tests *ex-vivo*.

Les résultats obtenus sur la sécrétion des exosomes par les lignées cellulaires ont été complétés par l'équipe par une étude quantitative des exosomes sécrétés chez les patients atteints de LAM en fonction de leur l'expression du CD81 par les blastes. Sur 27 patients adultes, la concentration sanguine en exosomes au diagnostic, évaluée par deux méthodes distinctes, était significativement plus élevée dans le groupe CD81+ par rapport au groupe CD81-.

La sécrétion d'exosomes semble donc être une piste très intéressante pour expliquer l'impact pronostique de CD81 dans les LAM, et non exclusive puisqu'elle peut avoir un lien avec l'adhésion et la chimiorésistance.

6. Hypothèses mécanistiques et perspectives pour l'étude des voies de signalisation :

Les résultats de ce travail venant compléter les données de la littérature permettent de formuler plusieurs hypothèses mécanistiques permettant d'expliquer le rôle pronostique du CD81 (Figure 47) :

1/ Le CD81 s'associe à une intégrine et forme un complexe intégrine-tétraspamine induisant l'activation d'une ou plusieurs voies de signalisation.

2/ La voie de signalisation la plus probable semble à l'heure actuelle la voie Rac connue pour induire une polymérisation des filaments d'actine et une réorganisation

du cytosquelette (217), conduisant à une augmentation des propriétés d'adhésion, de migration et d'invasion cellulaires.

3/ L'activation de Rac pourrait être soit :

- directe : il a en effet déjà été montré une interaction directe entre la protéine Rac et le domaine C-terminal intracytoplasmique de CD81 (218).
- soit indirecte *via* une autre voie de signalisation.

Les pistes d'étude concernant ces voies de signalisation sont nombreuses, nous pouvons retenir :

- La voie MAPK-ERK, comme déjà montré dans un modèle d'infection au VHC (142,219) ; ce d'autant que plusieurs travaux ont établi une corrélation entre cette voie et l'activation de Rac (220,221).
- La voie PI3K-AKT : l'équipe de In-Hee Hong *et al.* a montré une association entre l'expression de CD81 et la mobilité des cellules de mélanome par l'induction de l'expression de MT1-MMP (175).

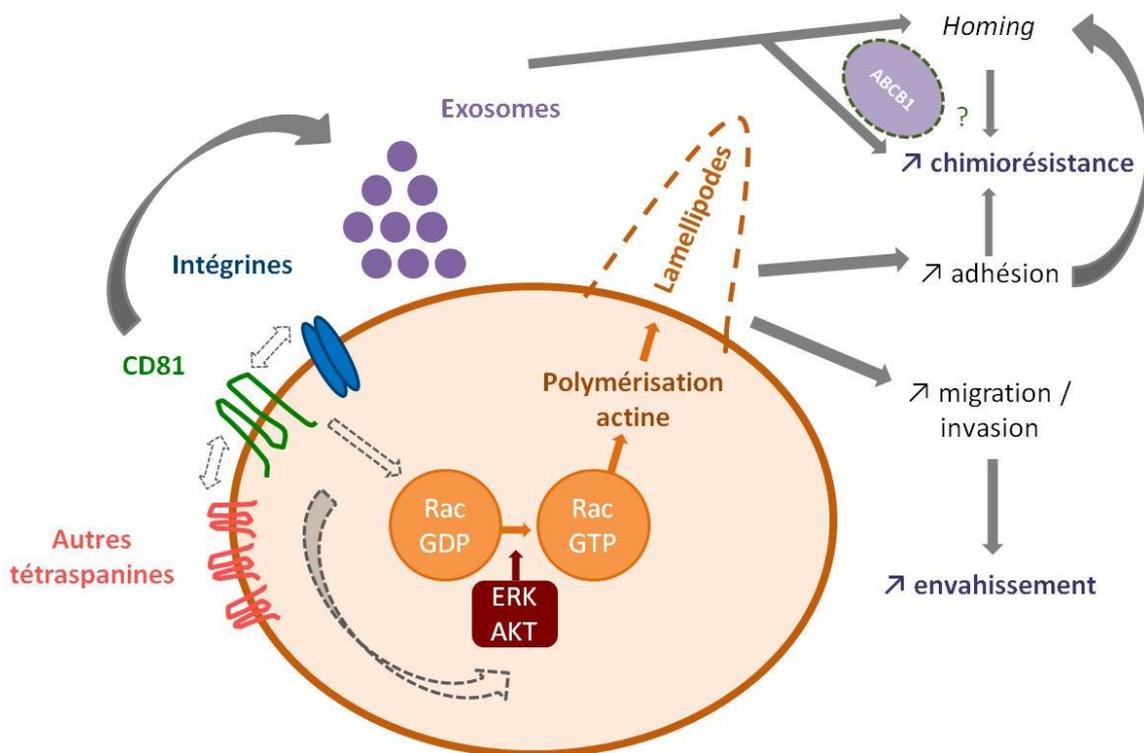


Figure 47 : Représentation schématique de mes hypothèses mécanistiques expliquant le rôle pronostique de CD81 dans les LAM

Les flèches en pointillées représentent des mécanismes hypothétique alors que les traits pleins sont des mécanismes démontrés.

Perspectives

De ces résultats se dégagent trois perspectives :

1/ L'étude des voies de signalisation et des partenaires du CD81.

Les tétraspanines agissent en réseau, il semble donc qu'une étape clé à la compréhension du mécanisme d'action du CD81 soit la découverte de son/ses partenaires. Ces voies de signalisation sont d'autant plus importantes à étudier qu'elles pourraient constituer une cible thérapeutique.

2/ L'approfondissement du travail sur les exosomes.

Nous avons quantifié les exosomes et nous souhaitons maintenant évaluer l'impact de l'expression du CD81 sur le contenu des exosomes, notamment en ARN ; cela qui pourrait nous permettre de comprendre le rôle de CD81 dans les phénomènes d'adhésion-migration et la chimiorésistance.

3/ La réalisation, *in vivo* de traitement par anticorps anti-CD81 sur le modèle de xénogreffe NSG.

L'enjeu du ciblage moléculaire du CD81 apparaît intéressant en infectiologie et les récents résultats obtenus avec l'anticorps anti-CD81 sur le modèle de lymphome B sont séduisants. J'aimerais donc tester l'anticorps anti-CD81 sur notre modèle murin. Dans l'hypothèse d'un effet sur la chimiorésistance, le traitement par anticorps pourrait être associé à une chimiothérapie conventionnelle.

Conclusions

Dans ce travail portant sur les marqueurs pronostiques dans les LAM, j'ai démontré que deux marqueurs robustes, accessibles et indépendants sont de mauvais pronostic chez les patients atteints de LAM.

- ABCB1, serait un reflet indirect d'une forme de LAM de haut risque. Son étude au diagnostic pourrait aider à la prise en charge puisque les patients avec une faible expression d'ABCB1 pourraient bénéficier d'un traitement anti-CD33 par GO associé à la chimiothérapie conventionnelle.

- CD81 augmente les capacités d'adhésion, de migration, d'invasion et la chimiorésistance des blastes myéloïdes; ce phénomène est médié par la formation de lamellipodes et ferait intervenir des partenaires et voies de signalisation qui restent à élucider.

Références bibliographiques

1. Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 sept 2003;100(Suppl 1):11842-9.
2. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*. 5 janv 2012;119(1):34-43.
3. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 22 nov 2011;105(11):1684-92.
4. Maynadié M, Angelis RD, Marcos-Gragera R, Visser O, Allemani C, Tereanu C, et al. Survival of European patients diagnosed with myeloid malignancies: a HAEMACARE study. *Haematologica*. 1 févr 2013;98(2):230-8.
5. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The Molecular Basis of Leukemia. *Hematology*. 1 janv 2004;2004(1):80-97.
6. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. juill 1997;3(7):730-7.
7. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 15 déc 2008;112(13):4793-807.
8. Döhner H. Implication of the Molecular Characterization of Acute Myeloid Leukemia. *Hematology*. 1 janv 2007;2007(1):412-9.
9. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 30 juill 2009;114(5):937-51.
10. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 26 janv 2017;129(4):424-47.

11. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med*. 4 févr 2016;374(5):422-33.
12. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 22 mars 2018;131(12):1275-91.
13. Boyd AL, Aslostovar L, Reid J, Ye W, Tanasijevic B, Porras DP, et al. Identification of Chemotherapy-Induced Leukemic-Regenerating Cells Reveals a Transient Vulnerability of Human AML Recurrence. *Cancer Cell*. 10 2018;34(3):483-498.e5.
14. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 23 2017;129(12):1577-85.
15. Alison MR, Lin W-R, Lim SML, Nicholson LJ. Cancer stem cells: in the line of fire. *Cancer Treat Rev*. oct 2012;38(6):589-98.
16. Vargaftig J, Taussig DC, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Lister TA, Cavenagh J, et al. Frequency of Leukemic Initiating Cells does not depend on the xenotransplantation model used. *Leukemia*. avr 2012;26(4):858-60.
17. Jordan CT. Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. *Curr Opin Cell Biol*. déc 2004;16(6):708-12.
18. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 17 févr 1994;367(6464):645-8.
19. Sutherland HJ, Blair A, Zapf RW. Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood*. 1 juin 1996;87(11):4754-61.
20. Sarry J-E, Murphy K, Perry R, Sanchez PV, Secreto A, Keefer C, et al. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ -deficient mice. *J Clin Invest*. janv 2011;121(1):384-95.
21. Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, Griessinger E, Sharrock K, Luke T, et al. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood*. 11 mars 2010;115(10):1976-84.

22. Blair A, Hogge DE, Sutherland HJ. Most Acute Myeloid Leukemia Progenitor Cells With Long-Term Proliferative Ability In Vitro and In Vivo Have the Phenotype CD34+/CD71-/HLA-DR-. *Blood*. 1 déc 1998;92(11):4325- 35.
23. Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood*. 1 mai 1997;89(9):3104- 12.
24. Feller N, Kelder A, Westra G, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. Positive selection for CD90 as a purging option in acute myeloid leukemia stem cell transplants. *Cytometry B Clin Cytom*. janv 2008;74(1):9- 16.
25. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*. oct 2000;14(10):1777- 84.
26. van Rhenen A, van Dongen GAMS, Kelder A, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood*. 1 oct 2007;110(7):2659- 66.
27. Bonardi F, Fusetti F, Deelen P, van Gosliga D, Vellenga E, Schuringa JJ. A proteomics and transcriptomics approach to identify leukemic stem cell (LSC) markers. *Mol Cell Proteomics*. mars 2013;12(3):626- 37.
28. Kikushige Y, Miyamoto T. Identification of TIM-3 as a Leukemic Stem Cell Surface Molecule in Primary Acute Myeloid Leukemia. *Oncology*. 2015;89 Suppl 1:28- 32.
29. Vergez F, Green AS, Tamburini J, Sarry J-E, Gaillard B, Cornillet-Lefebvre P, et al. High levels of CD34+CD38low/-CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucémies Aiguës et Maladies du Sang (GOELAMS) study. *Haematologica*. 12 janv 2011;96(12):1792- 8.
30. Kersten B, Valkering M, Wouters R, van Amerongen R, Hanekamp D, Kwidama Z, et al. CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub-populations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. avr 2016;173(2):219- 35.
31. Goardon N, Marchi E, Atzberger A, Quek L, Schuh A, Soneji S, et al. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 18 janv 2011;19(1):138- 52.
32. Boyer T, Gonzales F, Plesa A, Peyrouze P, Barthelemy A, Guihard S, et al. Flow Cytometry to Estimate Leukemia Stem Cells in Primary Acute Myeloid Leukemia

- and in Patient-derived-xenografts, at Diagnosis and Follow Up. *J Vis Exp*. 26 mars 2018;(133).
33. Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*. déc 2016;540(7633):433- 7.
 34. He N, Zhang L, Cui J, Li Z. Bone Marrow Vascular Niche: Home for Hematopoietic Stem Cells. *Bone Marrow Research* [Internet]. 2014 [cité 3 déc 2019];2014. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009113/>
 35. Quesnel B. Niches hématopoïétiques et cellules souches. *EMC - Hématologie*. nov 2012;7(4):1- 9.
 36. Shafat MS, Gnaneswaran B, Bowles KM, Rushworth SA. The bone marrow microenvironment – Home of the leukemic blasts. *Blood Reviews*. 1 sept 2017;31(5):277- 86.
 37. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotech*. nov 2007;25(11):1315- 21.
 38. Kumar B, Garcia M, Murakami JL, Chen C-C. Exosome-mediated microenvironment dysregulation in leukemia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1 mars 2016;1863(3):464- 70.
 39. Saito Y, Uchida N, Tanaka S, Suzuki N, Tomizawa-Murasawa M, Sone A, et al. Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nature Biotechnology* [Internet]. 14 févr 2010 [cité 14 nov 2014]; Disponible sur: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov.doc-distant.univ-lille2.fr/pmc/articles/PMC3857633/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/doc-distant.univ-lille2.fr/pmc/articles/PMC3857633/)
 40. Rhenen A van, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S, et al. High Stem Cell Frequency in Acute Myeloid Leukemia at Diagnosis Predicts High Minimal Residual Disease and Poor Survival. *Clin Cancer Res*. 15 sept 2005;11(18):6520- 7.
 41. Witte K-E, Ahlers J, Schäfer I, André M, Kerst G, Scheel-Walter H-G, et al. High proportion of leukemic stem cells at diagnosis is correlated with unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. mars 2011;28(2):91- 9.

42. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 30 2013;368(22):2059- 74.
43. Klco JM, Spencer DH, Miller CA, Griffith M, Lamprecht TL, O'Laughlin M, et al. Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 17 mars 2014;25(3):379- 92.
44. Wang K, Sanchez-Martin M, Wang X, Knapp KM, Koche R, Vu L, et al. Patient-derived xenotransplants can recapitulate the genetic driver landscape of acute leukemias. *Leukemia*. 2017;31(1):151- 8.
45. Pearce DJ, Taussig D, Zibara K, Smith L-L, Ridler CM, Preudhomme C, et al. AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. *Blood*. 1 févr 2006;107(3):1166- 73.
46. Huls M, Russel FGM, Masereeuw R. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *J Pharmacol Exp Ther*. janv 2009;328(1):3- 9.
47. Choi YH, Yu A-M. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr Pharm Des*. 2014;20(5):793- 807.
48. Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(7):452- 64.
49. Marie JP, Zittoun R, Sikic BI. Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood*. 1 août 1991;78(3):586- 92.
50. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Calmard-Oriol P, Tsuruo T, Troncy J, et al. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood*. 15 janv 1992;79(2):473- 6.
51. Legrand O, Simonin G, Perrot JY, Zittoun R, Marie JP. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 15 juin 1998;91(12):4480- 8.
52. Pirker R, Wallner J, Geissler K, Linkesch W, Haas OA, Bettelheim P, et al. MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 15 mai 1991;83(10):708- 12.

53. Guerci A, Merlin JL, Missoum N, Feldmann L, Marchal S, Witz F, et al. Predictive value for treatment outcome in acute myeloid leukemia of cellular daunorubicin accumulation and P-glycoprotein expression simultaneously determined by flow cytometry. *Blood*. 15 avr 1995;85(8):2147- 53.
54. Shi P, Zha J, Guo X, Chen F, Fan Z, Huang F, et al. Idarubicin is superior to daunorubicin in remission induction of de novo acute myeloid leukemia patients with high MDR1 expression. *Pharmacogenomics*. janv 2013;14(1):17- 23.
55. Walter RB, Gooley TA, van der Velden VHJ, Loken MR, van Dongen JJM, Flowers DA, et al. CD33 expression and P-glycoprotein-mediated drug efflux inversely correlate and predict clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia treated with gemtuzumab ozogamicin monotherapy. *Blood*. 15 mai 2007;109(10):4168- 70.
56. Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev*. sept 1990;42(3):155- 99.
57. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*. 1 déc 2001;98(12):3212- 20.
58. Wattel E, Solary E, Hecquet B, Caillot D, Ifrah N, Brion A, et al. Quinine improves the results of intensive chemotherapy in myelodysplastic syndromes expressing P glycoprotein: results of a randomized study. *Br J Haematol*. sept 1998;102(4):1015- 24.
59. Solary E, Witz B, Caillot D, Moreau P, Desablens B, Cahn JY, et al. Combination of quinine as a potential reversing agent with mitoxantrone and cytarabine for the treatment of acute leukemias: a randomized multicenter study. *Blood*. 15 août 1996;88(4):1198- 205.
60. Solary E, Drenou B, Campos L, de Crémoux P, Mugneret F, Moreau P, et al. Quinine as a multidrug resistance inhibitor: a phase 3 multicentric randomized study in adult de novo acute myelogenous leukemia. *Blood*. 15 août 2003;102(4):1202- 10.
61. Greenberg PL, Lee SJ, Advani R, Tallman MS, Sikic BI, Letendre L, et al. Mitoxantrone, etoposide, and cytarabine with or without valspodar in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: a phase III trial (E2995). *J Clin Oncol*. 15 mars 2004;22(6):1078- 86.
62. Kolitz JE, George SL, Marcucci G, Vij R, Powell BL, Allen SL, et al. P-glycoprotein inhibition using valspodar (PSC-833) does not improve outcomes

- for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808. *Blood*. 2 sept 2010;116(9):1413- 21.
63. van der Holt B, Löwenberg B, Burnett AK, Knauf WU, Shepherd J, Piccaluga PP, et al. The value of the MDR1 reversal agent PSC-833 in addition to daunorubicin and cytarabine in the treatment of elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia (AML), in relation to MDR1 status at diagnosis. *Blood*. 15 oct 2005;106(8):2646- 54.
 64. Kolitz JE, George SL, Dodge RK, Hurd DD, Powell BL, Allen SL, et al. Dose escalation studies of cytarabine, daunorubicin, and etoposide with and without multidrug resistance modulation with PSC-833 in untreated adults with acute myeloid leukemia younger than 60 years: final induction results of Cancer and Leukemia Group B Study 9621. *J Clin Oncol*. 1 nov 2004;22(21):4290- 301.
 65. Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*. oct 2004;2(10):e301.
 66. Lin KK, Rossi L, Boles NC, Hall BE, George TC, Goodell MA. CD81 Is Essential for the Re-entry of Hematopoietic Stem Cells to Quiescence following Stress-Induced Proliferation Via Deactivation of the Akt Pathway. *PLoS Biol*. 13 sept 2011;9(9):e1001148.
 67. Vaickus L, Levy R. Antiproliferative monoclonal antibodies: detection and initial characterization. *J Immunol*. sept 1985;135(3):1987- 97.
 68. Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol*. août 1990;10(8):4007- 15.
 69. Engel P, Tedder TF. New CD from the B cell section of the Fifth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. *Leuk Lymphoma*. 1994;13 Suppl 1:61- 4.
 70. Levy S. Function of the tetraspanin molecule CD81 in B and T cells. *Immunol Res*. mai 2014;58(2- 3):179- 85.
 71. Bradbury LE, Kansas GS, Levy S, Evans RL, Tedder TF. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J Immunol*. 1 nov 1992;149(9):2841- 50.

72. Shoham T, Rajapaksa R, Boucheix C, Rubinstein E, Poe JC, Tedder TF, et al. The Tetraspanin CD81 Regulates the Expression of CD19 During B Cell Development in a Postendoplasmic Reticulum Compartment. *J Immunol*. 15 oct 2003;171(8):4062- 72.
73. Boismenu R, Rhein M, Fischer WH, Havran WL. A role for CD81 in early T cell development. *Science*. 12 janv 1996;271(5246):198- 200.
74. Maecker HT, Levy S. Normal Lymphocyte Development but Delayed Humoral Immune Response in CD81-null Mice. *J Exp Med*. 21 avr 1997;185(8):1505- 10.
75. Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol*. févr 2005;5(2):136- 48.
76. Quast T, Eppler F, Semmling V, Schild C, Homsy Y, Levy S, et al. CD81 is essential for the formation of membrane protrusions and regulates Rac1-activation in adhesion-dependent immune cell migration. *Blood*. 18 août 2011;118(7):1818- 27.
77. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 30 oct 1998;282(5390):938- 41.
78. Garcia E, Pion M, Pelchen-Matthews A, Collinson L, Arrighi J-F, Blot G, et al. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic*. juin 2005;6(6):488- 501.
79. Tham TN, Gouin E, Rubinstein E, Boucheix C, Cossart P, Pizarro-Cerda J. Tetraspanin CD81 is required for *Listeria monocytogenes* invasion. *Infect Immun*. janv 2010;78(1):204- 9.
80. Silvie O, Rubinstein E, Franetich J-F, Prenant M, Belnoue E, Rénia L, et al. Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat Med*. janv 2003;9(1):93- 6.
81. Fénéant L, Levy S, Cocquerel L. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses*. 6 févr 2014;6(2):535- 72.
82. Pan Y, Geisert DF, Orr WE, Geisert EE. The effects of a CD81 null mutation on retinal pigment epithelium in mice. *Neurochem Res*. avr 2011;36(4):569- 73.
83. Rubinstein E, Ziyat A, Prenant M, Wrobel E, Wolf J-P, Levy S, et al. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Dev Biol*. 15 févr 2006;290(2):351- 8.

84. Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci.* févr 2003;28(2):106- 12.
85. Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* mai 1997;11(6):428- 42.
86. Hemler ME. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nat Rev Cancer.* janv 2014;14(1):49- 60.
87. Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci.* août 2001;58(9):1189- 205.
88. Termini CM, Gillette JM. Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5:34.
89. Detchokul S, Williams ED, Parker MW, Frauman AG. Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment: implications for metastasis and therapeutic strategies. *Br J Pharmacol.* déc 2014;171(24):5462- 90.
90. Yang Y-G, Sari IN, Zia MF, Lee SR, Song SJ, Kwon HY. Tetraspanins: Spanning from solid tumors to hematologic malignancies. *Exp Hematol.* mai 2016;44(5):322- 8.
91. Rorive S, Lopez XM, Maris C, Trepant A-L, Sauvage S, Sadeghi N, et al. TIMP-4 and CD63: new prognostic biomarkers in human astrocytomas. *Mod Pathol.* oct 2010;23(10):1418- 28.
92. Miyake M, Nakano K, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Itoi S, et al. Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res.* 15 sept 1995;55(18):4127- 31.
93. Deng X, Li Q, Hoff J, Novak M, Yang H, Jin H, et al. Integrin-associated CD151 drives ErbB2-evoked mammary tumor onset and metastasis. *Neoplasia.* août 2012;14(8):678- 89.
94. Sadej R, Romanska H, Kavanagh D, Baldwin G, Takahashi T, Kalia N, et al. Tetraspanin CD151 regulates transforming growth factor beta signaling: implication in tumor metastasis. *Cancer Res.* 15 juill 2010;70(14):6059- 70.
95. Lafleur MA, Xu D, Hemler ME. Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Mol Biol Cell.* avr 2009;20(7):2030- 40.

96. Gustafson-Wagner E, Stipp CS. The CD9/CD81 tetraspanin complex and tetraspanin CD151 regulate $\alpha\beta 1$ integrin-dependent tumor cell behaviors by overlapping but distinct mechanisms. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e61834.
97. Yoo SH, Lee K, Chae JY, Moon KC. CD151 expression can predict cancer progression in clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology*. janv 2011;58(2):191-7.
98. Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Hattori N, Taki T, Hasegawa H, et al. Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br J Cancer*. 7 juill 2003;89(1):158-67.
99. Sordat I, Decraene C, Silvestre T, Petermann O, Auffray C, Piétu G, et al. Complementary DNA arrays identify CD63 tetraspanin and alpha3 integrin chain as differentially expressed in low and high metastatic human colon carcinoma cells. *Lab Invest*. déc 2002;82(12):1715-24.
100. Miyamoto S, Maruyama A, Okugawa K, Akazawa K, Baba H, Maehara Y, et al. Loss of motility-related protein 1 (MRP1/CD9) and integrin alpha3 expression in endometrial cancers. *Cancer*. 1 août 2001;92(3):542-8.
101. Voss MA, Gordon N, Maloney S, Ganesan R, Ludeman L, McCarthy K, et al. Tetraspanin CD151 is a novel prognostic marker in poor outcome endometrial cancer. *Br J Cancer*. 10 mai 2011;104(10):1611-8.
102. Zou Q, Xiong L, Yang Z, Lv F, Yang L, Miao X. Expression levels of HMGA2 and CD9 and its clinicopathological significances in the benign and malignant lesions of the gallbladder. *World J Surg Oncol*. 21 mai 2012;10:92.
103. Yang Y-M, Zhang Z-W, Liu Q-M, Sun Y-F, Yu J-R, Xu W-X. Overexpression of CD151 predicts prognosis in patients with resected gastric cancer. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e58990.
104. Chen Z, Gu S, Trojanowicz B, Liu N, Zhu G, Dralle H, et al. Down-regulation of TM4SF is associated with the metastatic potential of gastric carcinoma TM4SF members in gastric carcinoma. *World J Surg Oncol*. 27 avr 2011;9:43.
105. Funakoshi T, Tachibana I, Hoshida Y, Kimura H, Takeda Y, Kijima T, et al. Expression of tetraspanins in human lung cancer cells: frequent downregulation of CD9 and its contribution to cell motility in small cell lung cancer. *Oncogene*. 6 févr 2003;22(5):674-87.
106. Zheng R, Yano S, Zhang H, Nakataki E, Tachibana I, Kawase I, et al. CD9 overexpression suppressed the liver metastasis and malignant ascites via

- inhibition of proliferation and motility of small-cell lung cancer cells in NK cell-depleted SCID mice. *Oncol Res.* 2005;15(7- 8):365- 72.
107. Si Z, Hersey P. Expression of the neuroglandular antigen and analogues in melanoma. CD9 expression appears inversely related to metastatic potential of melanoma. *Int J Cancer.* 22 avr 1993;54(1):37- 43.
 108. Radford KJ, Thorne RF, Hersey P. Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. *J Immunol.* 1 avr 1997;158(7):3353- 8.
 109. Hong I-K, Jeoung D-I, Ha K-S, Kim Y-M, Lee H. Tetraspanin CD151 stimulates adhesion-dependent activation of Ras, Rac, and Cdc42 by facilitating molecular association between β 1 integrins and small GTPases. *J Biol Chem.* 14 sept 2012;287(38):32027- 39.
 110. Hong I-K, Jin Y-J, Byun H-J, Jeoung D-I, Kim Y-M, Lee H. Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways. *J Biol Chem.* 25 août 2006;281(34):24279- 92.
 111. White A, Lamb PW, Barrett JC. Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines. *Oncogene.* 18 juin 1998;16(24):3143- 9.
 112. Lee H-A, Park I, Byun H-J, Jeoung D, Kim Y-M, Lee H. Metastasis Suppressor KAI1/CD82 Attenuates the Matrix Adhesion of Human Prostate Cancer Cells by Suppressing Fibronectin Expression and β 1 Integrin Activation. *CPB.* 2011;27(5):575- 86.
 113. Ang J, Fang B-L, Ashman LK, Frauman AG. The migration and invasion of human prostate cancer cell lines involves CD151 expression. *Oncol Rep.* déc 2010;24(6):1593- 7.
 114. Vasse M, Colin S, Guilmain W, Creoff E, Muraine M, Vannier J-P, et al. [Tetraspanins: A new target for antiangiogenic therapy?]. *Ann Pharm Fr.* mars 2015;73(2):100- 7.
 115. Beckwith KA, Byrd JC, Muthusamy N. Tetraspanins as therapeutic targets in hematological malignancy: a concise review. *Front Physiol* [Internet]. 23 mars 2015 [cité 17 avr 2015];6. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4369647/>

116. Copeland BT, Bowman MJ, Ashman LK. Genetic ablation of the tetraspanin CD151 reduces spontaneous metastatic spread of prostate cancer in the TRAMP model. *Mol Cancer Res.* janv 2013;11(1):95- 105.
117. Testa JE, Brooks PC, Lin JM, Quigley JP. Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res.* 1 août 1999;59(15):3812- 20.
118. Kohno M, Hasegawa H, Miyake M, Yamamoto T, Fujita S. CD151 enhances cell motility and metastasis of cancer cells in the presence of focal adhesion kinase. *Int J Cancer.* 20 janv 2002;97(3):336- 43.
119. Haeuw J-F, Goetsch L, Bailly C, Corvaia N. Tetraspanin CD151 as a target for antibody-based cancer immunotherapy. *Biochem Soc Trans.* avr 2011;39(2):553- 8.
120. Zijlstra A, Lewis J, Degryse B, Stuhlmann H, Quigley JP. The inhibition of tumor cell intravasation and subsequent metastasis via regulation of in vivo tumor cell motility by the tetraspanin CD151. *Cancer Cell.* mars 2008;13(3):221 - 34.
121. Gesierich S, Berezovskiy I, Ryschich E, Zöller M. Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. *Cancer Res.* 15 juill 2006;66(14):7083- 94.
122. Lapalombella R, Yeh Y-Y, Wang L, Ramanunni A, Rafiq S, Jha S, et al. Tetraspanin CD37 Directly Mediates Transduction of Survival and Apoptotic Signals. *Cancer Cell.* 15 mai 2012;21(5):694- 708.
123. Byrd JC, Murphy T, Howard RS, Lucas MS, Goodrich A, Park K, et al. Rituximab using a thrice weekly dosing schedule in B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma demonstrates clinical activity and acceptable toxicity. *J Clin Oncol.* 15 avr 2001;19(8):2153- 64.
124. Deckert J, Park PU, Chicklas S, Yi Y, Li M, Lai KC, et al. A novel anti-CD37 antibody-drug conjugate with multiple anti-tumor mechanisms for the treatment of B-cell malignancies. *Blood.* 14 nov 2013;122(20):3500- 10.
125. Nakamoto T, Murayama Y, Oritani K, Boucheix C, Rubinstein E, Nishida M, et al. A novel therapeutic strategy with anti-CD9 antibody in gastric cancers. *J Gastroenterol.* 2009;44(9):889- 96.
126. Ovalle S, Gutiérrez-López MD, Olmo N, Turnay J, Lizarbe MA, Majano P, et al. The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *Int J Cancer.* 15 nov 2007;121(10):2140- 52.

127. Lagaudrière-Gesbert C, Le Naour F, Lebel-Binay S, Billard M, Lemichez E, Boquet P, et al. Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cell Immunol.* 15 déc 1997;182(2):105- 12.
128. Leung KT, Chan KY, Ng PC, Lau TK, Chiu WM, Tsang KS, et al. The tetraspanin CD9 regulates migration, adhesion, and homing of human cord blood CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 10 févr 2011;117(6):1840- 50.
129. Yamazaki H, Xu CW, Naito M, Nishida H, Okamoto T, Ghani FI, et al. Regulation of cancer stem cell properties by CD9 in human B-acute lymphoblastic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 27 mai 2011;409(1):14- 21.
130. Nishida H, Yamazaki H, Yamada T, Iwata S, Dang NH, Inukai T, et al. CD9 correlates with cancer stem cell potentials in human B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 24 avr 2009;382(1):57- 62.
131. Arnaud M-P, Vallée A, Robert G, Bonneau J, Leroy C, Varin-Blank N, et al. CD9, a key actor in the dissemination of lymphoblastic leukemia, modulating CXCR4-mediated migration via RAC1 signaling. *Blood.* 8 oct 2015;126(15):1802- 12.
132. Leung KT, Zhang C, Chan KY, Li K, Cheung JTK, Ng MHL, et al. CD9 blockade suppresses disease progression of high-risk pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and enhances chemosensitivity. *Leukemia.* 17 oct 2019;
133. Bradstock K, Matthews J, Benson E, Page F, Bishop J. Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. Australian Leukaemia Study Group. *Blood.* 15 août 1994;84(4):1220- 5.
134. Gupta SK, Chopra A, Singh S, Kumar R, Bakhshi S, Kumar L, et al. Absence of CD9 expression in acute myeloid leukemia: possible correlation with t(8;21). *Int J Lab Hematol.* juin 2015;37(3):e56-58.
135. Liu Y-R, Zhu H-H, Ruan G-R, Qin Y-Z, Shi H-X, Lai Y-Y, et al. NPM1-mutated acute myeloid leukemia of monocytic or myeloid origin exhibit distinct immunophenotypes. *Leuk Res.* juill 2013;37(7):737- 41.
136. Touzet L, Dumezy F, Roumier C, Berthon C, Bories C, Quesnel B, et al. CD9 in acute myeloid leukemia: Prognostic role and usefulness to target leukemic stem cells. *Cancer Med.* mars 2019;8(3):1279- 88.

137. Kwon HY, Bajaj J, Ito T, Blevins A, Konuma T, Weeks J, et al. Tetraspanin 3 Is Required for the Development and Propagation of Acute Myelogenous Leukemia. *Cell Stem Cell*. 6 août 2015;17(2):152-64.
138. Vences-Catalán F, Duault C, Kuo C-C, Rajapaksa R, Levy R, Levy S. CD81 as a tumor target. *Biochem Soc Trans*. 15 avr 2017;45(2):531-5.
139. Owens DM, Watt FM. Influence of beta1 integrins on epidermal squamous cell carcinoma formation in a transgenic mouse model: alpha3beta1, but not alpha2beta1, suppresses malignant conversion. *Cancer Res*. 1 juill 2001;61(13):5248-54.
140. Hong I-K, Byun H-J, Lee J, Jin Y-J, Wang S-J, Jeoung D-I, et al. The tetraspanin CD81 protein increases melanoma cell motility by up-regulating metalloproteinase MT1-MMP expression through the pro-oncogenic Akt-dependent Sp1 activation signaling pathways. *J Biol Chem*. 30 mai 2014;289(22):15691-704.
141. Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, et al. Exosomes Mediate Stromal Mobilization of Autocrine Wnt-PCP Signaling in Breast Cancer Cell Migration. *Cell*. 21 déc 2012;151(7):1542-56.
142. Carloni V, Mazzocca A, Ravichandran KS. Tetraspanin CD81 is linked to ERK/MAPKinase signaling by Shc in liver tumor cells. *Oncogene*. 26 févr 2004;23(8):1566-74.
143. Vences-Catalán F, Rajapaksa R, Srivastava MK, Marabelle A, Kuo C-C, Levy R, et al. Tetraspanin CD81 promotes tumor growth and metastasis by modulating the functions of T regulatory and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*. 1 nov 2015;75(21):4517-26.
144. Mazzocca A, Liotta F, Carloni V. Tetraspanin CD81-regulated cell motility plays a critical role in intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. juill 2008;135(1):244-256.e1.
145. Yoo T-H, Ryu B-K, Lee M-G, Chi S-G. CD81 is a candidate tumor suppressor gene in human gastric cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. avr 2013;36(2):141-53.
146. Lee M-S, Kim JH, Lee J-S, Yun SJ, Kim W-J, Ahn H, et al. Prognostic Significance of CREB-Binding Protein and CD81 Expression in Primary High Grade Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: Identification of Novel Biomarkers for Bladder Cancer Using Antibody Microarray. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0125405.

147. Luo RF, Zhao S, Tibshirani R, Myklebust JH, Sanyal M, Fernandez R, et al. CD81 protein is expressed at high levels in normal germinal center B cells and in subtypes of human lymphomas. *Hum Pathol.* févr 2010;41(2):271 - 80.
148. Paiva B, Gutiérrez N-C, Chen X, Vídriales M-B, Montalbán M-Á, Rosiñol L, et al. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. *Leukemia.* août 2012;26(8):1862- 9.
149. Paiva B, Puig N, Cedena MT, de Jong BG, Ruiz Y, Rapado I, et al. Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. *Leukemia.* févr 2017;31(2):382- 92.
150. Fofana I, Xiao F, Thumann C, Turek M, Zona L, Tawar RG, et al. A novel monoclonal anti-CD81 antibody produced by genetic immunization efficiently inhibits Hepatitis C virus cell-cell transmission. *PLoS ONE.* 2013;8(5):e64221.
151. Ji C, Liu Y, Pamulapati C, Bohini S, Fertig G, Schraeml M, et al. Prevention of hepatitis C virus infection and spread in human liver chimeric mice by an anti-CD81 monoclonal antibody. *Hepatology.* avr 2015;61(4):1136- 44.
152. Vexler V, Yu L, Pamulapati C, Garrido R, Grimm HP, Sriraman P, et al. Target-mediated drug disposition and prolonged liver accumulation of a novel humanized anti-CD81 monoclonal antibody in cynomolgus monkeys. *MAbs.* oct 2013;5(5):776- 86.
153. Masciopinto F, Freer G, Burgio VL, Levy S, Galli-Stampino L, Bendinelli M, et al. Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection. *Virology.* 20 déc 2002;304(2):187- 96.
154. Vences-Catalán F, Kuo C-C, Rajapaksa R, Duault C, Andor N, Czerwinski DK, et al. CD81 is a novel immunotherapeutic target for B cell lymphoma. *J Exp Med.* 1 juill 2019;216(7):1497- 508.
155. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* 2017;27(3):172- 88.
156. Zöller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer.* janv 2009;9(1):40- 55.
157. Malla RR, Pandrangi S, Kumari S, Gavara MM, Badana AK. Exosomal tetraspanins as regulators of cancer progression and metastasis and novel diagnostic markers. *Asia Pac J Clin Oncol.* déc 2018;14(6):383- 91.

158. Steinbichler TB, Dudás J, Riechelmann H, Skvortsova I-I. The role of exosomes in cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 1 juin 2017;44:170- 81.
159. Lowry MC, Gallagher WM, O'Driscoll L. The Role of Exosomes in Breast Cancer. *Clinical Chemistry*. 1 déc 2015;61(12):1457- 65.
160. Caivano A, Laurenzana I, De Luca L, La Rocca F, Simeon V, Trino S, et al. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders. *Tumour Biol*. déc 2015;36(12):9739- 52.
161. Szczepanski MJ, Szajnik M, Welsh A, Whiteside TL, Boyiadzis M. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-beta1. *Haematologica*. sept 2011;96(9):1302- 9.
162. Huan J, Hornick NI, Shurtleff MJ, Skinner AM, Goloviznina NA, Roberts CT, et al. RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes. *Cancer Res*. 15 janv 2013;73(2):918- 29.
163. Hornick NI, Huan J, Doron B, Goloviznina NA, Lapidus J, Chang BH, et al. Serum Exosome MicroRNA as a Minimally-Invasive Early Biomarker of AML. *Scientific Reports*. 12 juin 2015;5:11295.
164. Hornick NI, Doron B, Abdelhamed S, Huan J, Harrington CA, Shen R, et al. AML suppresses hematopoiesis by releasing exosomes that contain microRNAs targeting c-MYB. *Sci Signal*. 06 2016;9(444):ra88.
165. Bouvy C, Wannez A, Laloy J, Chatelain C, Dogné J-M. Transfer of multidrug resistance among acute myeloid leukemia cells via extracellular vesicles and their microRNA cargo. *Leuk Res*. 2017;62:70- 6.
166. Corrado C, Saieva L, Raimondo S, Santoro A, De Leo G, Alessandro R. Chronic myelogenous leukaemia exosomes modulate bone marrow microenvironment through activation of epidermal growth factor receptor. *J Cell Mol Med*. 2016;20(10):1829- 39.
167. Pando A, Reagan JL, Quesenberry P, Fast LD. Extracellular vesicles in leukemia. *Leukemia Research*. 1 janv 2018;64:52- 60.
168. Hong C-S, Funk S, Muller L, Boyiadzis M, Whiteside TL. Isolation of biologically active and morphologically intact exosomes from plasma of patients with cancer. *J Extracell Vesicles [Internet]*. 24 mars 2016 [cité 7 nov 2016];5. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4808740/>

169. Huan J, Hornick N, Goloviznina N, Kamimae- Lanning A, David L, Wilmarth P, et al. Coordinate regulation of residual bone marrow function by paracrine trafficking of AML exosomes. *Leukemia*. déc 2015;29(12):2285- 95.
170. Kumar B, Garcia M, Weng L, Jung X, Murakami JL, Hu X, et al. Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia*. 2018;32(3):575- 87.
171. Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Yoshida M, Murata M, Murase K, et al. Extracellular vesicle miR-7977 is involved in hematopoietic dysfunction of mesenchymal stromal cells via poly(rC) binding protein 1 reduction in myeloid neoplasms. *Haematologica*. avr 2016;101(4):437- 47.
172. Umezu T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene*. 30 mai 2013;32(22):2747- 55.
173. Liu Y, Zhao L, Li D, Yin Y, Zhang C-Y, Li J, et al. Microvesicle-delivery miR-150 promotes tumorigenesis by up-regulating VEGF, and the neutralization of miR-150 attenuate tumor development. *Protein Cell*. déc 2013;4(12):932- 41.
174. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 18 févr 2013;200(4):373- 83.
175. Hong C-S, Muller L, Whiteside TL, Boyiadzis M. Plasma Exosomes as Markers of Therapeutic Response in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Front Immunol [Internet]*. 10 avr 2014 [cité 16 juin 2015];5. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3989594/>
176. Boyer T, Guihard S, Roumier C, Peyrouze P, Gonzales F, Berthon C, et al. Tetraspanin CD81 is an adverse prognostic marker in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 22 août 2016;
177. Boyer T, Gonzales F, Barthélémy A, Marceau-Renaut A, Peyrouze P, Guihard S, et al. Clinical Significance of ABCB1 in Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Study. *Cancers (Basel)*. 6 sept 2019;11(9).
178. Zevian SC, Johnson JL, Winterwood NE, Walters KS, Herndon ME, Henry MD, et al. CD151 promotes $\alpha 3\beta 1$ integrin-dependent organization of carcinoma cell junctions and restrains collective cell invasion. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(11):1626- 40.
179. Winterwood NE, Varzavand A, Meland MN, Ashman LK, Stipp CS. A critical role for tetraspanin CD151 in $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrin-dependent tumor cell functions on laminin-5. *Mol Biol Cell*. juin 2006;17(6):2707- 21.

180. Yamada M, Sekiguchi K. Molecular Basis of Laminin-Integrin Interactions. *Curr Top Membr.* 2015;76:197- 229.
181. Steinbach D, Legrand O. ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra? *Leukemia.* juin 2007;21(6):1172- 6.
182. Hirsch P, Tang R, Marzac C, Perrot J-Y, Fava F, Bernard C, et al. Prognostic impact of high ABC transporter activity in 111 adult acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics when compared to FLT3, NPM1, CEBPA and BAALC. *Haematologica.* févr 2012;97(2):241- 5.
183. Shaffer BC, Gillet J-P, Patel C, Baer MR, Bates SE, Gottesman MM. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist Updat.* avr 2012;15(1- 2):62- 9.
184. Weber S, Alpermann T, Dicker F, Jeromin S, Nadarajah N, Eder C, et al. BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* janv 2014;4(1):e173.
185. Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, Whitman SP, Paschka P, Mrózek K, et al. High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood.* 1 juin 2008;111(11):5371- 9.
186. Schwind S, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Holland KB, et al. BAALC and ERG expression levels are associated with outcome and distinct gene and microRNA expression profiles in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood.* 16 déc 2010;116(25):5660- 9.
187. Tiribelli M, Raspadori D, Geromin A, Cavallin M, Sirianni S, Simeone E, et al. High CD200 expression is associated with poor prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia, even in FLT3-ITD-/NPM1+ patients. *Leuk Res.* 2017;58:31- 8.
188. Coles SJ, Hills RK, Wang ECY, Burnett AK, Man S, Darley RL, et al. Increased CD200 expression in acute myeloid leukemia is linked with an increased frequency of FoxP3+ regulatory T cells. *Leukemia.* sept 2012;26(9):2146- 8.

189. Klukovits A, Krajcsi P. Mechanisms and therapeutic potential of inhibiting drug efflux transporters. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 3 juin 2015;11(6):907- 20.
190. Yu M, Ocana A, Tannock IF. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? *Cancer Metastasis Rev*. 1 juin 2013;32(1):211- 27.
191. Sharom FJ, Tamaki A, Ierano C, Szakacs G, Robey RW, Bates SE. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays Biochem*. 7 sept 2011;50:209- 32.
192. Linenberger ML, Hong T, Flowers D, Sievers EL, Gooley TA, Bennett JM, et al. Multidrug-resistance phenotype and clinical responses to gemtuzumab ozogamicin. *Blood*. 15 août 2001;98(4):988- 94.
193. Molina S, Castet V, Pichard-Garcia L, Wychowski C, Meurs E, Pascussi J-M, et al. Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol*. janv 2008;82(1):569- 74.
194. Montpellier C, Tews BA, Poitrimole J, Rocha-Perugini V, D'Arienzo V, Potel J, et al. Interacting Regions of CD81 and Two of Its Partners, EWI-2 and EWI-2wint, and Their Effect on Hepatitis C Virus Infection. *J Biol Chem*. 22 avr 2011;286(16):13954- 65.
195. Ishikawa F. Modeling normal and malignant human hematopoiesis in vivo through newborn NSG xenotransplantation. *Int J Hematol*. déc 2013;98(6):634- 40.
196. Saland E, Boutzen H, Castellano R, Pouyet L, Griessinger E, Larrue C, et al. A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2015;5:e297.
197. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 6 août 2009;114(6):1150- 7.
198. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med*. sept 2003;9(9):1158- 65.
199. Carloni V, Mazzocca A, Mello T, Galli A, Capaccioli S. Cell fusion promotes chemoresistance in metastatic colon carcinoma. *Oncogene*. 23 mai 2013;32(21):2649- 60.

200. Quagliano A, Gopalakrishnapillai A, Kolb EA, Barwe S. Modulation of CD81 By Epigenetic Drug Combination Sensitizes Acute Lymphoblastic Leukemia Via Decreased BTK Signaling. *Blood*. 13 nov 2019;134(Supplement_1):2628- 2628.
201. Quagliano A, Gopalakrishnapillai A, Kolb EA, Barwe S. Epigenetic Drug Combination Overcomes Bone Marrow Microenvironment-Induced Chemoprotection in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Via Modulation of CD81. *Blood*. 29 nov 2018;132(Supplement 1):3957- 3957.
202. Quagliano A, Gopalakrishnapillai A, Barwe SP. Epigenetic drug combination overcomes osteoblast-induced chemoprotection in pediatric acute lymphoid leukemia. *Leuk Res*. mai 2017;56:36- 43.
203. Miyazaki T, Müller U, Campbell KS. Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *EMBO J*. 16 juill 1997;16(14):4217- 25.
204. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 15 sept 2005;106(6):1901- 10.
205. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. févr 2006;6(2):93- 106.
206. Marjon KD, Termini CM, Karlen KL, Saito-Reis C, Soria CE, Lidke KA, et al. Tetraspanin CD82 regulates bone marrow homing of acute myeloid leukemia by modulating the molecular organization of N-cadherin. *Oncogene*. 4 août 2016;35(31):4132- 40.
207. Zhang F, Michaelson JE, Moshiah S, Sachs N, Zhao W, Sun Y, et al. Tetraspanin CD151 maintains vascular stability by balancing the forces of cell adhesion and cytoskeletal tension. *Blood*. 13 oct 2011;118(15):4274- 84.
208. Behr S, Schriever F. Engaging CD19 or target of an antiproliferative antibody 1 on human B lymphocytes induces binding of B cells to the interfollicular stroma of human tonsils via integrin alpha 4/beta 1 and fibronectin. *J Exp Med*. 1 nov 1995;182(5):1191- 9.
209. Wang H-X, Sharma C, Knoblich K, Granter SR, Hemler ME. EWI-2 negatively regulates TGF- β signaling leading to altered melanoma growth and metastasis. *Cell Res*. mars 2015;25(3):370- 85.
210. Small J, Rottner K, Hahne P, Anderson KI. Visualising the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech*. 1 oct 1999;47(1):3- 17.

211. Coffey GP, Rajapaksa R, Liu R, Sharpe O, Kuo C-C, Krauss SW, et al. Engagement of CD81 induces ezrin tyrosine phosphorylation and its cellular redistribution with filamentous actin. *J Cell Sci.* 1 sept 2009;122(17):3137-44.
212. Crotta S, Ronconi V, Olivieri C, Baldari CT, Valiante NM, Valiente NM, et al. Cytoskeleton rearrangement induced by tetraspanin engagement modulates the activation of T and NK cells. *Eur J Immunol.* avr 2006;36(4):919-29.
213. Martins SA, Correia PD, Dias RA, da Cruz E Silva OAB, Vieira SI. CD81 Promotes a Migratory Phenotype in Neuronal-Like Cells. *Microsc Microanal.* 2019;25(1):229-35.
214. Viola S, Traer E, Huan J, Hornick NI, Tyner JW, Agarwal A, et al. Alterations in acute myeloid leukaemia bone marrow stromal cell exosome content coincide with gains in tyrosine kinase inhibitor resistance. *British Journal of Haematology.* 2016;172(6):983-6.
215. Wojtuszkiewicz A, Schuurhuis GJ, Kessler FL, Piersma SR, Knol JC, Pham TV, et al. Exosomes Secreted by Apoptosis-Resistant Acute Myeloid Leukemia (AML) Blasts Harbor Regulatory Network Proteins Potentially Involved in Antagonism of Apoptosis. *Mol Cell Proteomics.* avr 2016;15(4):1281-98.
216. Bebawy M, Combes V, Lee E, Jaiswal R, Gong J, Bonhoure A, et al. Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells. *Leukemia.* sept 2009;23(9):1643-9.
217. Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR. Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol.* sept 2008;10(9):1039-50.
218. Tejera E, Rocha-Perugini V, López-Martín S, Pérez-Hernández D, Bachir AI, Horwitz AR, et al. CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. *Mol Biol Cell.* 1 févr 2013;24(3):261-73.
219. Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, Weiner A, Zhu Q, Pizza M, et al. CD81 Is a Central Regulator of Cellular Events Required for Hepatitis C Virus Infection of Human Hepatocytes. *J Virol.* sept 2008;82(17):8316-29.
220. Vial E, Sahai E, Marshall CJ. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell.* juill 2003;4(1):67-79.

221. Ryan MB, Finn AJ, Pedone KH, Thomas NE, Der CJ, Cox AD. ERK/MAPK Signaling Drives Overexpression of the Rac-GEF, PREX1, in BRAF- and NRAS-Mutant Melanoma. *Mol Cancer Res.* 2016;14(10):1009- 18.

ANNEXE I

Boyer T, Gonzales F, Barthélémy A, Marceau-Renaut A, Peyrouze P, Guihard S, et al. Clinical Significance of ABCB1 in Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Study. *Cancers (Basel)*. 6 sept 2019;11(9) (177).