



**HAL**  
open science

# Etude de l'impact des adipocytes de la moelle osseuse sur le développement et la chimiorésistance des leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T)

Julien Calvo

► **To cite this version:**

Julien Calvo. Etude de l'impact des adipocytes de la moelle osseuse sur le développement et la chimiorésistance des leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T). Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP7114 . tel-03094525

**HAL Id: tel-03094525**

**<https://theses.hal.science/tel-03094525>**

Submitted on 4 Jan 2021

**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.

## Université de Paris

ECOLE DOCTORALE 561 - HEMATOLOGIE, ONCOGENESE et BIOTHERAPIES

LABORATOIRE DE RECHERCHE SUR LES CELLULES SOUCHES

HÉMATOPOÏÉTIQUES ET LEUCÉMIQUES

*Année 2019*

*N° attribué par la bibliothèque*

# Étude de l'impact des adipocytes de la moelle osseuse sur le développement et la chimiorésistance des leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T)

**Par Julien Calvo**

Thèse de doctorat de Biologie spécialité Oncologie

Dirigée par la Docteur Françoise Pflumio

*Présentée et soutenue publiquement le 31 octobre 2019*

*Devant un jury composé de :*

Monsieur le Docteur Jacques Ghysdael	DRE CNRS, UMR 3348, Université Paris Saclay	Président
Madame la Professeur Olaia Naveiras	MD/PhD, SNS Professor, EPFL	Rapporteuse
Monsieur le Docteur Cyril Broccardo	CRCN Inserm, U1037, Université Toulouse III	Rapporteur
Monsieur le Professeur Arnaud Petit	PU-PH, UMR_S 938, Université Sorbonne	Examineur
Monsieur le Professeur Olivier Kosmider	PU-PH, U1016, UMR 8104, Université Paris 5	Examineur
Madame la Docteur Françoise Pflumio	DR1 Inserm, CEA, U1274, Université Paris 7 & 11	Directrice de thèse





# Remerciements

---

J'adresse mes sincères remerciements à **Olaia Naveiras** et **Cyril Broccardo** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Merci aux différents membres de mes comités de suivi de thèse : **Olaia Naveiras**, **Thomas Mercher**, **Stéphane Prost**, **Olivier Kosmider** et **Daniel Lewandowski**. J'ai pris énormément de plaisir à discuter science avec vous. Je vous remercie pour votre patience, vos conseils avisés et votre bienveillance. Les discussions menées lors des différents comités de suivi de thèse ont toujours été très enrichissantes.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma sympathie à **Françoise Pflumio**. Merci sincèrement pour la confiance que tu m'as accordée depuis 12 ans. Mon évolution professionnelle je te la dois. J'espère avoir accompli un travail digne de ta confiance. Merci également d'avoir toujours constitué un « micro » -environnement idéal de travail. Merci pour tes conseils, pour nos discussions scientifiques plus ou moins proches des projets que tu m'as confiés. Je salue aussi ta grande rigueur scientifique.

Je souhaite également remercier les gens qui ont constitué « la belle époque » et dont certains sont encore là tels d'irréductibles gaulois. Plus que des collègues vous êtes tous devenus des amis. **Aissa**, je retiens de notre rencontre ta bonne humeur communicative, tes grandes convictions humaines. Ton enthousiasme et ta boulimie bibliographique étaient débordants. Notre immersion en Algérie reste un souvenir incroyable. Nombreux sont mes souvenirs dans le Mzab qui définissent, je crois, la personne que tu es ! **Philippe**, merci de tes encouragements et de ta bienveillance. Ta pugnacité est un modèle. Je suis depuis quelques années bien seul à discuter passion automobile. Dans cet univers où ce qui excède 4 cylindres doit disparaître, je me sens bien seul ! **Bastien**, que de souvenirs partagés, des simples binouses consommées à Malakoff, à Cochin, à Clamart, à Fontenay aux roses (ça fait beaucoup de binouses ça) à nos virées en Vespa dans Paris. Nous formions un duo de choc et bosser à tes côtés fut passionnant. **Florence**, j'ai également appris beaucoup en te côtoyant excepté le désordre que tu es la seule à maîtriser à ce point. **Irina**, je souhaite tout particulièrement te remercier de ton accompagnement bienveillant durant ces 12 ans. Tu restes pour moi un grand repère dans le laboratoire. Merci de tes conseils de lectures, de voyages et d'expos. **Lucine**, bravo pour ton parcours, je suis sincèrement fier de toi. Merci d'avoir tout le temps été d'accord avec moi même quand je disais de grosses âneries, c'est très rassurant ! A l'avenir, si tu as la moindre question en BTP, surtout n'hésite pas.

**Benjamin**, merci de ton décroisement, il m'a fait le plus grand bien. Ta fraîcheur quotidienne a été grandement utile. Spécial Kasdedi : « L'humour est une déclaration de dignité, une affirmation de la suprématie de l'homme sur ce qui lui arrive » Romain Gary, j'aurai pu te citer du MC Solaar mais Romain Gary c'est plus classe ! Merci également à **Sara, Julien, Paola, Marie-Christine, Sandrine, Dhouha, Vanessa, Sophie, Fabio, Daniel, Rima, Marie.**

Merci aux membres des plateformes : **Julien Tilliet, Véronique Neville, Nathalie Dechamps et Jan Bajer.**

Merci à toute l'équipe : **Guillaume**, je suis arrivé trop tard pour te rencontrer à Cochin mais j'ai grand plaisir à te retrouver au LSHL. **Charly**, tes sorties théâtrales apportent une certaine fraîcheur au laboratoire. Merci également à **Laurent, Elia, Marie-Laure et Rima** pour ta patience et ton écoute lorsqu'il me vient l'envie de discuter CLP, LMPP et Liban.

Merci aux différents stagiaires que j'ai encadré : **Emma** pour ton humour et l'intérêt que tu as porté au projet, je n'ai toujours pas compris le concept des tacots ! **Thomas** pour tes recommandations musicales et l'énergie que tu as déployée à comprendre l'implication du CXCR4 et du CD44 exprimés à la surface des cellules leucémiques dans la moelle osseuse riche en adipocytes.

Merci aux amis d'avoir écouté ou pas mes doléances : **Aurélie, Marc, Adeline, Pierre-Yves, Audrey, Oliver, Amélie, Aurélien, Charles, Cécile, Florent, Aurélien, William, Sandrine, Sébastien et Agnès !**

**Stéphane**, un énorme merci, j'ai découvert et aimé la recherche fondamentale à tes cotés.

Merci à **Paul Henri Roméo** de m'avoir accueilli dans son institut et permis de rencontrer **Aude.**

« La science est un jeu dont la règle du jeu consiste à trouver  
quelle est la règle du jeu »

François Cavanna

Pour Darius et Coline  
Pour Aude, tu es mon équilibre

# Table des matières

---

<b>Liste des figures et des tableaux</b> .....	4
<b>Liste des abréviations</b> .....	6
<b>Avant-propos</b> .....	8
<b>Introduction</b> .....	10
<b>I. L'hématopoïèse</b> .....	10
I.1 Généralités .....	10
I.2 Les cellules souches hématopoïétiques.....	10
I.3 Les différents compartiments de l'arbre hématopoïétique.....	12
I.3.a Vision classique de la hiérarchie hématopoïétique.....	13
I.3.a.i chez la souris.....	13
I.3.a.ii chez l'homme.....	14
I.3.b Vision actuelle de l'hématopoïèse.....	14
I.3.c Composition de la MO.....	17
I.4 La lymphopoïèse T.....	18
I.4.a Généralités.....	18
I.4.b Le thymus.....	19
I.4.c L'évolution des expressions des marqueurs de surface.....	20
I.4.d Réarrangements du TCR $\gamma$ , $\delta$ , $\beta$ et $\alpha$ et sélections thymiques.....	21
I.4.e Les protéines de la famille NOTCH.....	23
<b>II. Les molécules impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire</b> .....	26
II.1 Les protéines de la famille CD44.....	26
II.1.a Du gène à la protéine.....	26
II.1.b L'expression de la protéine CD44 au cours de la thymopoïèse.....	27
II.1.c Rôle du CD44 dans les tumeurs.....	28
II.2 La voie de signalisation CXCR4.....	30
II.2.a Le récepteur et son ligand le CXCL12.....	30
II.2.b Quelles sont les cellules sécrétrices du CXCL12 dans la MO ?.....	31
II.2.c Implication du récepteur CXCR4 dans l'hématopoïèse.....	32
II.2.d Participation du récepteur CXCR4 à la progression tumorale.....	33
<b>III. Hémopathies malignes</b> .....	35
<b>IV. Les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques T (LAL-T)</b> .....	36
IV.1 Généralités.....	36
IV.2 Classification phénotypique des LAL-T.....	36
IV.3 Modèles expérimentaux pour étudier les LAL-T.....	37
IV.3.a Modèle d'étude <i>in vitro</i> .....	37
IV.3.b Modèle d'étude <i>in vivo</i> .....	38
IV.4 Traitements des LAL-T.....	39
IV.4.a Généralités.....	39
IV.4.b Résistance et Rechute.....	40
IV.5 Altérations génétiques et épigénétiques des LAL-T.....	41
IV.5.a La voie de signalisation NOTCH1 dans les LAL-T.....	42

IV.5.b	Protéines régulatrices de la progression du cycle cellulaire.....	43
IV.5.c	Protéines kinases des différentes voies de signalisation.....	43
IV.5.d	Facteurs épigénétiques.....	44
IV.5.e	Régulation de la traduction.....	45
IV.5.f	Facteurs de transcription.....	45
IV.6	Leucémogénèse des LAL-T.....	47
IV.6.a	Les cellules initiatrices (CILs) ou souches (CSLs) de la LAL-T.....	48
IV.6.b	Les cellules pré-leucémiques (pré-CSLs).....	50
IV.6.c	Les cellules à l'origine de la LAL-T.....	52
IV.7	Rôle du microenvironnement dans le développement des LAL-T.....	54
IV.7.a	Facteurs solubles.....	54
IV.7.b	Interactions cellulaires ou interactions avec la matrice extracellulaire.....	57
IV.7.c	Résistance des LAL-T et Cellules Souches Mésoenchymateuses.....	59
IV.7.d	Modification du microenvironnement par les LAL-T.....	60
V.	Le tissu adipeux.....	62
V.1	Définition et classification.....	62
V.1.a	Le tissu adipeux blanc (WAT).....	62
V.1.b	Le tissu adipeux brun (BAT).....	62
V.1.c	Le tissu adipeux médullaire (MAT).....	63
V.1.d	Les facteurs sécrétés : les adipocytokines.....	65
V.1.e	Le statut hypoxique du tissu adipeux.....	65
V.2	Les adipocytes et l'hématopoïèse.....	66
V.2.a	Tissu adipeux blanc et régulation de l'hématopoïèse.....	66
V.2.a.i	Les cellules immunitaires.....	66
V.2.a.ii	Les progéniteurs et les cellules souches hématopoïétiques.....	67
V.2.b	Impact des adipocytes de MO sur l'hématopoïèse.....	68
V.3	Interaction entre le tissu adipeux et les hémopathies.....	71
V.3.a	Le WAT et les hémopathies.....	71
V.3.a.i	L'importance des acides gras dans les hémopathies.....	72
V.3.a.ii	Les adipocytokines et les hémopathies.....	73
V.3.b	Interactions entre les adipocytes de MO et les hémopathies.....	74
V.3.b.i	Le MAT : niche pour les hémopathies.....	74
V.3.b.ii	Le MAT : une niche de chimiorésistance des hémopathies.....	75
<b>Objectifs</b>	.....	77
<b>Article 1</b>	.....	79
<b>Article 2</b>	.....	110
<b>Résultats</b>	.....	119
I.	Les vertèbres caudales protègent <i>in vivo</i> les cellules leucémiques des chimiothérapies.....	119
II.	Mobilisation des cellules leucémiques : axe CXCR4/CXCL12.....	120
III.	Analyse fonctionnelle de la diminution d'expression de surface de CXCR4.....	124
III.1.	Analyse fonctionnelle de l'axe CXCR4/CXCL12 <i>in vitro</i> sur les cellules leucémiques issues des vertèbres thoraciques et caudales.....	124
III.2.	Analyse de la capacité de migration vers la MO fémorale des cellules leucémiques originaires des deux territoires médullaires.....	125

IV. Rôle de l'expression de CD44 par les cellules leucémiques de LAL-T.....	126
IV.1. Analyse de l'expression des variants de CD44 dans les LAL-T.....	126
IV.2. Rôle de l'augmentation d'expression de CD44s à la surface des cellules leucémiques des vertèbres caudales.....	127
V. Mise en place d'un modèle d'étude de la migration leucémique <i>in vivo</i> hors des MO d'intérêts.....	129
<b>Discussion et perspectives</b> .....	131
I. Education des cellules leucémiques par le microenvironnement médullaire riche en adipocytes.....	132
I.1. Pertinence des adipocytokines dans les caractéristiques observées.....	132
I.2. Les environnements riches en adipocytes sont pauvres en concentration d'oxygène.....	132
I.3. Modification métabolique des cellules leucémiques.....	134
I.4. Impact de la modification des marqueurs de surface.....	134
I.4.a. Niveau d'expression et fonction de CXCR4.....	134
I.4.b. Niveau d'expression et étude de CD44.....	136
II. Existe-t-il des « niches » dans la MO hématopoïétique qui induisent la chimiorésistance des cellules leucémiques?.....	138
III. Cellules Initiatrices de Leucémies (CILs).....	141
<b>Bibliographie</b> .....	143
<b>Annexes</b> .....	164
Annexe 1 : Hypoxia induces a dormancy state through mTOR signaling inhibition and promotes chemoresistance in T-ALL (soumis à Leukemia).	
Annexe 2 : Homeobox protein TLX3 activates miR-125b expression to promote T-cell acute lymphoblastic leukemia (Blood Advances).	
Annexe 3 : Speed of leukemia development and genetic diversity in xenograft models of T cell acute lymphoblastic leukemia (Oncotarget).	
Annexe 4 : Fratricide-resistant CD1a-specific CAR T cells for the treatment of cortical T- cell acute lymphoblastic leukemia (Blood)	
Annexe 5 : <i>DNMT3<sup>R882H</sup></i> mutant and <i>TET2</i> inactivation cooperate in the deregulation of DNA methylation control to induce lymphoid malignancies in mice (Leukemia).	

# Liste des figures et des tableaux

Liste des Figures (en face de la page n°)

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique des modèles de l'hématopoïèse normale	13
<b>Figure 2</b> : Schéma de la composition cellulaire de la MO et localisation des Cellules Souches Hematopoïétiques dans les différentes niches médullaires	17
<b>Figure 3</b> : Représentation de l'acquisition et de la perte d'expression des molécules de surface des thymocytes au cours de la différenciation lymphocytaire T humaines	21
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique de la différenciation lymphocytaire T intra-thymique	22
<b>Figure 5</b> : Schéma récapitulatif des clivages impliqués dans la voie de signalisation NOTCH	23
<b>Figure 6</b> : Représentation de la conformation du CD44 du gène à la protéine	26
<b>Figure 7</b> : Voies de signalisation activées suite à l'interaction de la chimiokine CXCL12 au récepteur CXCR4	30
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique des différences d'expressions du CXCL12 (point noir) par les constituants cellulaires de la MO	31
<b>Figure 9</b> : Les hémopathies représentées selon les classifications de l'OMS	35
<b>Figure 10</b> : Schéma de la réparation de cassure double brin de l'ADN par le système NHEJ (Non Homologous End Joining)	38
<b>Figure 11</b> : Schéma des différentes possibilités de rechutes des LAL-T	41
<b>Figure 12</b> : Fréquence des différentes altérations génétiques dans les LAL-T pédiatriques	42
<b>Figure 13</b> : Classification et pronostic des LAL-T en fonction de leur phénotype de surface et de leurs altérations génétiques	46
<b>Figure 14</b> : Modèles théoriques de l'hétérogénéité tumorale	47
<b>Figure 15</b> : Modèle de développement des LAL-T de la cellule originelle à la pathologie intégrant le concept des pré-CSLs et les CILs/CSLs	53
<b>Figure 16</b> : Schéma représentant les différentes interactions entre les cellules leucémiques et les différents composants cellulaires de la MO	59
<b>Figure 17</b> : Chaîne de la respiration mitochondriale des adipocytes du BAT avec la protéine découplante, UCP-1	62
<b>Figure 18</b> : Evolution du contenu adipeux de la MO au cours du vieillissement	63
<b>Figure 19</b> : Effets des adipocytes de MO sur l'hématopoïèse	69
<b>Figure 20</b> : Mise en place d'un protocole de poly-chimiothérapie de LAL-T greffées aux souris NSG	119
<b>Figure 21</b> : Pourcentage de cellules leucémiques de LAL-T #1 retrouvées dans les différents territoires médullaires à l'issue de 2 semaines de traitements	120
<b>Figure 22</b> : Concentration de CXCL12 dans des broyats de vertèbres thoraciques et caudales	121
<b>Figure 23</b> : Expression totale (intra- et extra-cellulaire) de la protéine CXCR4 analysée en cytométrie en flux	121
<b>Figure 24</b> : Mobilisation <i>in vivo</i> des cellules leucémiques de LAL-T #1 après injection de PBS ou AMD 3100 par la voie sous-cutanée	122
<b>Figure 25</b> : Analyse du nombre de cellules leucémiques détectées dans chaque territoire médullaire étudié 1 heure après la fin du traitement des souris	122
<b>Figure 26</b> : Plan expérimental de l'étude de la migration des cellules leucémiques de LAL-T issues des vertèbres thoraciques ou caudales induite par CXCL12	124



<b>Figure 27</b> : Migration <i>in vitro</i> des cellules leucémiques de LAL-T #5 issues des vertèbres thoraciques et caudales.....	124
<b>Figure 28</b> : Migration dans la MO fémorale des cellules leucémiques extraites des vertèbres thoraciques ou caudales.....	125
<b>Figure 29</b> : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de CD44 à la surface des cellules leucémiques.....	126
<b>Figure 30</b> : Quantification relative de l'expression des transcrits <i>CD44</i> rapportée à l'expression du transcrit de ménage ( <i>GAPDH</i> ) en RT-PCR quantitative.....	126
<b>Figure 31</b> : Diminution d'expressions de CD44 (transcrits et protéine) dans les cellules leucémiques de la LAL-T.....	127
<b>Figure 32</b> : Analyse du pourcentage de cellules leucémiques ShCtrl ou ShCD44 en apoptose et en phase G0 du cycle cellulaire.....	127
<b>Figure 33</b> : Suivi de la migration de cellules de LAL-T #1 ShCtrl et ShCD44 extraites des vertèbres thoraciques et caudales vers la MO fémorale.....	128
<b>Figure 34</b> : Représentation schématique de l'analyse des souris primaires.....	129
<b>Figure 35</b> : Cinétique de prise de greffe des cellules leucémiques la LAL-T #1 dans les différents territoires médullaires (Fémurs, vertèbres thoraciques et caudales) des souris secondaires en fonction du type d'implants greffés.....	130
<b>Figure 36</b> : Infiltrat leucémique des implants par les cellules de la LAL-T #1 mesuré lors du sacrifice des souris secondaires.....	130
<b>Figure 37</b> : Expression de LepR à la surface des cellules leucémiques de LAL-T.....	132
<b>Figure 38</b> : Analyse de l'expression du rapporteur fluorescent d'HIF-1 $\alpha$ des cellules leucémiques issues des différents sites.....	133
<b>Figure 39</b> : Analyse de la détection du Pimonidazole dans les cellules de LAL-T des différents territoires médullaires.....	133
<b>Figure 40</b> : Expression de CD36 à la surface de cellules de LAL-T issues des différents territoires médullaires.....	134
<b>Figure 41</b> : Analyse de l'expression transcriptomique de cellules uniques (Single Cell RNA Seq) pour étudier l'hétérogénéité cellulaire des LAL-T dans les vertèbres thoraciques et caudales.....	138
<b>Figure 42</b> : Répartition des cellules leucémiques issues soit des vertèbres thoraciques soit des vertèbres caudales dans les différents clusters identifiés.....	138
<b>Figure 43</b> : Niveau d'expression de 7 gènes impliqués dans la signature transcriptomique des clusters 1 et 4 dans la représentation en t-SNE.....	138

Liste des Tableaux (en face de la page n°)

<b>Tableau 1</b> : Classification EGIL des LAL-T intégrant le sous-groupe des ETP.....	36
<b>Tableau 2</b> : Adipocytokines sécrétées par les adipocytes des différents tissus adipeux.....	65

## Liste des abréviations

---

<b>AMPK</b> : AMP-activated protein Kinase	<b>EGIL</b> : European Group for the Immunological classification of Leukemias
<b>BAT</b> : Brown Adipose Tissue	<b>ERK</b> : Extracellular signal-regulated kinases
<b>BCL-2</b> : B cell Lymphoma 2	<b>ETP</b> : Early Thymic Progenitor
<b>BMI</b> : Body Mass Index	<b>EZH1/2</b> : Enhancer of Zeste Homolog 1/2
<b>CAR</b> : CXCL12 Abundant-Reticular cell	<b>FAT</b> : Fatty Acid Translocase
<b>CCL</b> : Chimiokines C-C motif ligand	<b>FBXW7</b> : F-Box/WD repeat domain protein 7
<b>CD</b> : Cluster de Differentiation	<b>G-CSF</b> : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
<b>CDK</b> : Cyclin-Dependent Kinase	<b>GMP</b> : Granulocyte/Macrophage lineage-restricted Progenitor
<b>CDKN</b> : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor	<b>HAS</b> : Hyaluronic Acid Synthetase
<b>CFU-C</b> : Colony Forming Unit-Cell	<b>HDAC</b> : Histone Deacetylase
<b>CFU-S</b> : Colony Forming Unit-Spleen	<b>HIF-1/2</b> : Hypoxia-Inducible Factor 1/2
<b>CIL</b> : Cellule Initiatrice de Leucémie	<b>HS-5</b> : Human Stroma cells 5
<b>CLEC9A</b> : C-Type Lectin domain family 9 member A	<b>ICN1</b> : Intracellular domain NOCTH1
<b>CLP</b> : Common Lymphoid Progenitors	<b>IGF</b> : Insulin Growth Factor
<b>CMH</b> : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	<b>IL</b> : Interleukine
<b>CMP</b> : Common Myeloid Progenitors	<b>ISP4</b> : Immature Single Positive 4
<b>CSCS</b> : Cellule Souche du Cancer du Sein	<b>JAG</b> : Jagged
<b>CSH</b> : Cellule Souche Hématopoïétique	<b>JAK</b> : Janus Kinase
<b>CSL</b> : Cellule Souche Leucémique	<b>KDM6A/B</b> : Lysine demethylase 6A/B
<b>CSL/RBPJ</b> : Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region	<b>LAL-T/B</b> : Leucémie Aiguë Lymphoblastique T/B
<b>CSM</b> : Cellule Souche Mesenchymateuse	<b>LAM</b> : Leucémie Aiguë Myéloïde
<b>CSPH</b> : Cellule Souche et Progéniteur Hématopoïétique	<b>LAMo</b> : Leucémie Aiguë Monocytaire
<b>cTEC</b> : cortex Thymic Epithelial Cell	<b>LAP</b> : Leucémie Aiguë Promyélocytaire
<b>CTGF</b> : Conjonctive Tissue Growth Factor	<b>Lck</b> : Lymphocyte specific protein tyrosine Kinase
<b>CXCL</b> : Chimiokines C-X-C motif Ligand	<b>LepR</b> : Leptin Receptor
<b>CXCR</b> : Chimiokines C-X-C motif Receptor	<b>LFA</b> : Lymphocyte function associated Antigen 1
<b>DC</b> : Dendritic cell	<b>LMC</b> : Leucémie Myéloïde Chronique
<b>DL1-4</b> : Delta Like 1-4	<b>LMO-1/2</b> : Lim domain Only 1/2
<b>DN</b> : Double Negatif	<b>LMPP</b> : Lymphoid-primed Multipotent Progenitors
<b>DNMT</b> : DNA methyl transferase	<b>LSK</b> : Lin <sup>-</sup> Sca1 <sup>+</sup> cKit <sup>+</sup>
<b>DP</b> : Double Positif	<b>LSKT</b> : Lin <sup>-</sup> Sca1 <sup>+</sup> cKit <sup>+</sup> Thy1 <sup>+</sup>
<b>DSL</b> : Delta Serrate Lag2	
<b>EED</b> : Embryonic Ectoderm Development homolog	

**LTC-IC** : Long Term Culture-Initiating Cells  
**LYL-1** : Lymphoblastic Leukemia associated hematopoietic regulator 1  
**MAML** : Mastermind like transcriptional co-activator  
**MATc** : Marrow Adipose Tissue constitutif  
**MATr** : Marrow Adipose Tissue régulé  
**MEC** : Matrice Extra-Cellulaire  
**MED12** : Mediator of RNA Polymerase II transcription, subunit 12  
**MEK** : Mitogen-activated protein kinase kinase  
**MEP** : Megakaryocyte/Erythrocyte lineage-restricted Progenitors  
**MLP** : Multi-Lymphoid Progenitor  
**MM** : Myélome Multiple  
**MMP** : Matric Metallopeptidase  
**MO** : Moelle Osseuse  
**MPP** : Multipotent Progenitors  
**MS5** : Mouse Stroma cells 5  
**mTEC** : medula Thymic Epithelial Cell  
**MYB** : Avian Myeloblastosis oncogene  
**MYC** : Myelocytomatosis oncogene  
**NF-1** : Neurofibromatosis 1  
**NHEJ** : Non-Homologous End Joining  
**NK** : Natural Killer  
**NKX** : NK2 Homeobox  
**NOD** : Non Obese Diabetic  
**NSG** : NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$   
**PDX** : Patient Derived Xenograft  
**PHF6** : Plant Homeodomain Finger protein 6  
**PI-3K** : Phosphoinositide 3 Kinase  
**PKA** : Protein Kinase A  
**PKC- $\theta$**  : Protein Kinase C- $\theta$   
**PPAR $\gamma$**  : Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$   
**PRC2** : Polycomb Repressive Complex

**PRDM1** : PR-Domain-containing protein 1  
**PTEN** : Phosphatase and Tensin homolog  
**PTPN11** : Protein Tyrosine Phosphatase Non receptor 11  
**RB** : Retinoblastoma  
**RBBP4/7** : Retinoblastoma Binding Protein 4/7  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**RPL** : Ribosomal Protein L  
**SCARB3** : Scavenger receptor class B member 3  
**SCID** : Severe Combined ImmunoDeficiency  
**SCO** : Sang de Cordon Ombilical  
**SDF-1** : Stroma Derived Factor 1  
**SLAM** : Signaling Lymphocytic Activation Molecule  
**SLAMF1** : Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family 1  
**SMD** : Syndrome Myélodysplasique  
**SMP** : Syndrome Myéloprolifératif  
**SP** : Simple Positif  
**STAT** : Signal Transducer and Activator of Transcription factor  
**SUZ12** : Suppressor of Zeste homolog 12  
**SVF** : Stroma Vascular Fraction  
**sWAT** : subcutaneous White Adipose Tissue  
**TAL-1/2** : T cell Acute Lymphoblastic leukemia 1/2  
**TCR** : T cell Receptor  
**TGF** : Tumor Growth Factor  
**TLX** : T cell leukemia homeobox protein  
**TSP** : Thymic Seeding Progenitor  
**UCP-1** : Uncoupling Protein 1  
**VLA** : Very Late Antigen  
**vWAT** : visceral White Adipose Tissue  
**WAT** : White Adipose Tissue  
**ZSC** : Zone sous-capsulaire

## Avant-propos

---

Les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (LAL) sont des hémopathies malignes caractérisées par la prolifération clonale de précurseurs hématopoïétiques lymphoïdes indifférenciés incapables d'achever leur maturation. Les LAL constituent le cancer de l'enfant le plus fréquent, représentant plus du tiers des tumeurs pédiatriques. On distingue deux types de LAL : les LAL-B et les LAL-T. Ces dernières sont issues de la transformation tumorale de précurseurs lymphocytaires T bloqués dans leur différenciation. Classiquement, on considère que les cellules leucémiques de LAL-T se développent dans le thymus et s'accumulent dans la moelle osseuse (MO), le sang, la rate, les ganglions lymphatiques. L'infiltration et l'accumulation des cellules leucémiques dans la MO interfèrent avec la production et la fonction des cellules hématopoïétiques normales. Il a été montré que les LAL-T touchent principalement deux populations en fonction de l'âge : les jeunes enfants et les adultes de plus de 50 ans. Elles représentent environ 15% des LAL de l'enfant et 25% des LAL de l'adulte. Les LAL-T constituent un groupe hétérogène, tant sur le plan phénotypique que moléculaire. Cliniquement, les LAL-T se manifestent par des signes d'insuffisance médullaire liés à l'envahissement de la MO par les cellules leucémiques, des masses médiastinales et parfois une infiltration méningée.

Au cours des 20 dernières années, les traitements des LAL-T se sont considérablement améliorés. Le taux de survie des LAL-T sans événement à 5 ans est actuellement inférieur à 50% pour les adultes, ce pourcentage pouvant diminuer jusqu'à moins de 10% de survie pour les personnes de plus de 60 ans et de 90% environ pour les enfants. Néanmoins, il existe un risque de rechute non négligeable. Certaines cellules leucémiques résistent à la chimiothérapie, puis survivent et prolifèrent pour entraîner ultérieurement la rechute. Les mécanismes à l'origine de cette chimiorésistance ne sont que très partiellement compris et les patients présentant une rechute ont un pronostic particulièrement défavorable.

Le développement d'une LAL-T est classiquement présenté comme un processus de sélection de cellules ayant acquis des anomalies génétiques et épigénétiques leur conférant un avantage de croissance, associées à des vagues d'expansions clonales. Or, le développement d'une hémopathie n'est pas seulement limité à l'accumulation d'anomalies intrinsèques, et l'étude du microenvironnement tumoral a pris depuis ces 15 dernières années une place primordiale dans le domaine de la recherche sur le cancer. Dans le cadre des LAL-T, le rôle de support de la croissance par le microenvironnement, tant par des facteurs solubles que par

des interactions intercellulaires, est de plus en plus étayé par une littérature grandissante. Il est aujourd'hui accepté que le microenvironnement participe aussi à la chimiorésistance des hémopathies.

Les constituants cellulaires de la MO sont : les ostéoblastes, les ostéoclastes, les cellules stromales/souches mésenchymateuses, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules nerveuses, les cellules hématopoïétiques et les adipocytes. Ce dernier type cellulaire s'accumule dans la MO depuis la naissance. Le tissu adipeux médullaire est catégorisé en deux types : le tissu adipeux médullaire constitutif et régulé. Comme son nom l'indique, le tissu adipeux médullaire constitutif est présent dès la naissance dans l'extrémité des os longs chez le mammifère et sa proportion semble rester identique tout au long de la vie. Le second tissu adipeux médullaire est quant à lui induit par le vieillissement, l'irradiation et/ou des agents chimiothérapeutiques.

L'influence du tissu adipeux médullaire dans les désordres métaboliques, hématopoïétiques et dans les hémopathies est de plus en plus établie. Dans mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés à étudier l'interaction entre les cellules leucémiques de LAL-T avec le tissu adipeux médullaire constitutif. Le modèle *in vivo* utilisé a été la transplantation des cellules leucémiques de patients à des souris immunodéficientes limitant ainsi les risques de rejets. Les souris présentent la particularité d'avoir un gradient cranio-caudal de la teneur en adipocytes dans la MO. Ainsi, les vertèbres thoraciques sont pauvres en adipocytes et riches en tissu hématopoïétique contrairement aux vertèbres caudales qui sont riches en adipocytes et pauvres en cellules hématopoïétiques. Grâce à ce modèle, nous avons étudié le devenir des cellules leucémiques dans ces deux territoires médullaires +/- riches en adipocytes.

# Introduction

---

## I. L'hématopoïèse

### I.1 Généralités

L'hématopoïèse est le processus physiologique qui permet de générer et de renouveler l'ensemble des différents éléments figurés du sang. Sont distingués les **érythrocytes** qui sont parfois nommés hématies, les **thrombocytes** que l'on nomme aussi plus couramment plaquettes et enfin les **leucocytes** qui se composent des cellules lymphoïdes (lymphocytes T, lymphocytes B et cellules « Natural Killer », NK) et des cellules myéloïdes (monocytes/macrophages et granulocytes).

Chez l'homme adulte, l'essentiel de ce tissu se développe dans la Moelle Osseuse (MO). Etant donné que la durée de vie des cellules matures du sang est relativement courte, l'hématopoïèse adulte humaine doit produire quotidiennement un nombre extrêmement élevé de ces cellules : plus de 100 milliards de granulocytes, 150 milliards de plaquettes et 250 milliards d'hématies. Cette production permanente est permise grâce aux propriétés particulières d'un contingent rare de cellules dans la MO qui siègent au sommet de la hiérarchie hématopoïétique et que l'on nomme les **Cellules Souches Hématopoïétiques** (CSHs).

### I.2 Les cellules souches hématopoïétiques

Les premiers travaux de L.O. Jacobson et de C.E. Ford démontrent l'existence de cellules de la MO de souris capables de régénérer une hématopoïèse efficace et de prévenir le décès de souris « receveuses » induit par l'irradiation à dose létale (revue dans (Eaves, 2015)).

Sur la base de cette étude, E. A. McCulloch et J. E. Till ont montré dans les années 60 que des souris « receveuses » irradiées puis injectées avec des faibles doses de cellules de MO d'une souris « donneuse/primaire » présentaient des nodules macroscopiques à la surface de leur rate. L'analyse de ces nodules a montré une composition hétérogène de sous populations cellulaires. Par l'utilisation de traceur d'ADN (obtenu suite à l'irradiation de la MO des souris primaires) ces chercheurs ont montré que les nodules étaient d'origines clonales. Ces premières études ont permis d'introduire la notion de différenciation clonogénique. Les nodules macroscopiques retrouvés sur les rates des souris transplantées seront nommés par la suite CFU-S (pour Colony Forming Unit-Spleen). La transplantation de ces nodules à d'autres souris « receveuses » a montré que certains nodules étaient capables de régénérer des CFU-S dont le contenu était là aussi hétérogène. L'ensemble de ces études a ainsi introduit à la fois la

notion de la différenciation multi-lignage, qui lorsqu'elle est faite à partir d'une cellule unique ou dont la descendance possède un marqueur clonal identique traduit **la multipotence**, ainsi que la notion de **l'auto-renouvellement**. Ces deux caractères définissent aujourd'hui fonctionnellement les **Cellules Souches Hématopoïétiques** (CSHs).

Ces travaux ont été le début d'une grande aventure qui mène aujourd'hui encore les chercheurs à définir et caractériser au mieux les CSHs (Eaves, 2015).

Pour cela l'utilisation des anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules de surface, associée à l'émergence de la cytométrie en flux et plus particulièrement du tri cellulaire dans les années 1980-90 ont permis l'isolement de nombreuses populations cellulaires de plus en plus enrichies en CSHs.

Chez la souris, les CSHs ont d'abord été identifiées parmi les cellules dépourvues de marqueurs de surface des cellules matures (lymphocytes T, B, granulocytes, érythrocytes ;  $\text{Lin}^-$ ), exprimant les molécules de surface Sca-1 (pour Stem Cell Antigen-1) et Thy-1, ainsi que le récepteur à activité tyrosine kinase Kit (cellules appelées  $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{Kit}^+ \text{Thy-1}^+$  ou LSK). En 1996, M. Osawa et ses collègues ont isolé au sein des cellules LSK murines, une sous population nommée « Long Term » CSH exprimant pas ou peu le cluster de différenciation CD34 (ligand de la L-sélectine) à la surface membranaire : cellules  $\text{LSK}/\text{CD34}^-$ . Ces cellules, qui représentent seulement 10% des LSK, sont capables de générer de façon pérenne l'hématopoïèse en transplantation en série de souris léthalement irradiées contrairement aux cellules  $\text{LSK}/\text{CD34}^+$ . C'est en 2005 que Kiel et ses collègues utilisent la famille des marqueurs SLAM (pour Signaling Lymphocytic Activation Molecule) pour montrer que l'expression de CD150/Slamf1 (pour Signaling lymphocytic activation molecule family 1) combinée à l'absence d'expression de CD48 enrichit en CSHs ( $\text{LSK} \text{CD34}^- \text{CD150}^+ \text{CD48}^-$ ) par rapport aux progéniteurs multipotents (Eaves, 2015; Jacobsen and Nerlov, 2019).

Historiquement chez l'homme, l'isolement d'une première population enrichie en CSHs a été réalisé grâce au marqueur de surface CD34. Il est exprimé sur 0.5 à 5% des cellules sanguines du foie fœtal, de SCO (pour Sang de Cordon Ombilical) et de la MO (Civin et al., 1984; Krause et al., 1996; Sasseti et al., 1998). L'enrichissement en CSHs humaines a pu être amélioré par l'ajout de l'expression du marqueur CD90, Thy-1, à la surface des cellules  $\text{CD34}^+/\text{Lin}^-$ . Cette population  $\text{CD34}^+ \text{CD90}^+ \text{Lin}^-$  qui représente 0.05 à 0.1% des cellules sanguines est capable de se différencier en lymphocytes T, B et en cellules myéloïdes à la fois *in vitro* et *in vivo* (Baum et al., 1992). Durant les années qui ont suivi, des travaux ont mis en évidence la corrélation entre l'expression de l'antigène CD38 et l'engagement dans la

différenciation. Cela a permis d'améliorer l'isolement des CSHs à travers le phénotype CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> (Bhatia et al., 1997; Hao et al., 1995). La fréquence en CSHs, appréciée en transplantation de souris immunodéficientes en dilution limite, des cellules CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> issues des prélèvements de MO ou de SCO est de 1/617 (Bhatia et al., 1997). L'ensemble de ces connaissances a permis dix années plus tard la fraction cellulaire CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD90<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> dont l'enrichissement en CSHs est estimé à 1/10 (Majeti et al., 2007). L'expression de l'intégrine  $\alpha 6$ , aussi nommée CD49f, a permis de fractionner la population précédente. Ainsi les cellules CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD90<sup>+</sup> CD49f<sup>+</sup> présentent un enrichissement en cellules capables de régénérer de l'hématopoïèse de 1/111.3 alors que les cellules répondant au phénotype suivant CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD90<sup>+</sup> CD49f<sup>+</sup> permet de définir la population cellulaire la plus enrichie en CSHs à ce jour (1/10.5) (Notta et al., 2011).

Des expériences de repopulation en souris immunodéficientes ont montré que des cellules quiescentes issues de la population CD34<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> isolées à partir de prélèvements de MO ou de SCO sont également douées d'autorenouvellement et de multipotence. Bien que leur fréquence soit faible, l'association de l'expression de ces marqueurs de surface à l'expression importante de CD93 (Anjos-Afonso et al., 2013) ou de CD133 (Takahashi et al., 2014) permet de grandement améliorer leur fréquence (respectivement 1/6100 et 1/142). Ces cellules, isolées des SCO pourraient, selon les auteurs, résider au sommet de la hiérarchie hématopoïétique humaine.

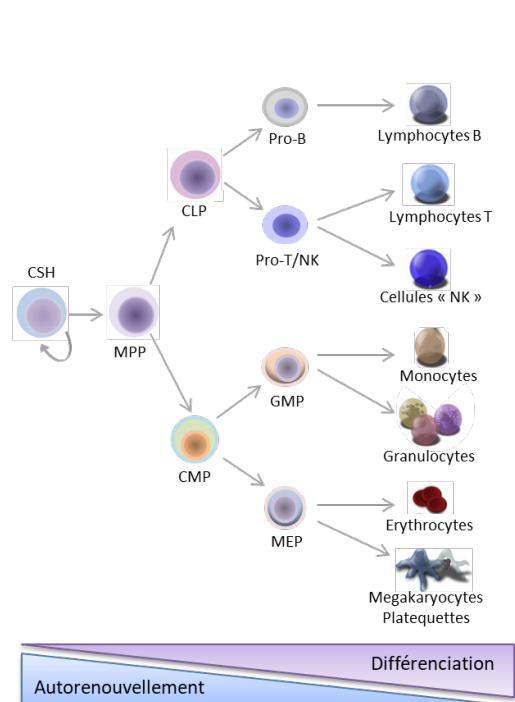
### I.3 Les différents compartiments de l'arbre hématopoïétique

L'arbre hématopoïétique a pu être défini par l'utilisation de modèle d'études *in vitro* et *in vivo*. Outre le test clonogénique *in vivo* précédemment mentionné, les CFU-S, a été mis au point un premier test clonogénique *in vitro*, en milieu semi-solide enrichi d'un cocktail de cytokines, nommé CFU-C (pour Colony-Forming Unit-Cells). Ce test est basé sur la capacité de certains progéniteurs hématopoïétiques à proliférer et à se différencier afin de former des « clusters » de cellules ou des colonies dans un milieu semi-solide en réponse à des cytokines différenciatrices. Chaque colonie correspond à la descendance d'un progéniteur unique. Le type de cellules présentes dans les colonies identifie le progéniteur myéloïde, érythroïde et lymphoïde B (uniquement chez la souris) à l'origine de la colonie.

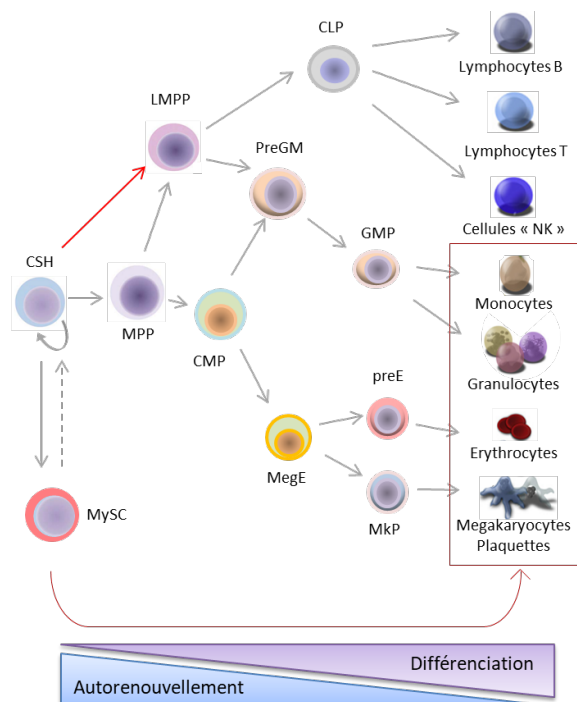
L'analyse de progéniteurs hématopoïétiques plus immatures est effectuée en deux temps. Une première phase de culture des cellules hématopoïétiques est réalisée au contact d'un stroma médullaire humain ou murin (la lignée de cellules stromales de MO de souris, appelée MS5 (pour Mouse Stroma cells 5), est couramment utilisée dans ce test) pendant 5 à 6



### A. Modèle classique



### B. Modèle actualisé



**Figure 1 : Représentation schématique des modèles de l'hématopoïèse normale.** A. le modèle classique de l'hématopoïèse présente une séparation précoce entre les lignages lymphoïdes et myéloïdes. Dans ce modèle les CSH donnent naissance aux MPP qui peuvent générer soit des CLP (lignage lymphoïde) soit des CMP (lignage myélo-érythroïde). B. le modèle révisé de l'hématopoïèse fait part d'un continuum de différenciation. Dans ce modèle les LMPP apparaissent immédiatement après les MPP et sont capable de générer à la fois le lignage lymphoïde mais aussi certaines cellules myéloïdes. Récemment s'ajoute l'existence d'une cellule souche myéloïde capable de générer des cellules myéloïdes et surtout des plaquettes. (adapté de Jacobsen S. E., 2019).

semaines et le produit de la culture est ensuite analysé par le test des CFU. Cette culture définit les progéniteurs immatures « LTC-IC » (pour Long Term Culture-Initiating Cells). La première étape de co-culture sur stroma médullaire peut être étendue afin de mettre en évidence des progéniteurs encore plus immatures. A ces expériences s'ajoute également la différenciation *in vitro* en milieu liquide qui rend compte de la capacité des populations cellulaires à générer des cellules « matures ». Enfin pour déchiffrer au mieux l'arbre hématopoïétique murin et humain, l'injection de cellules dans des souris ayant subi une myéloablation ainsi que l'utilisation de souris modifiées génétiquement afin d'offrir un modèle de plus en plus immunodéficient a permis d'analyser les potentiels de différenciation de nombreuses populations hématopoïétiques.

### I.3.a Vision classique de la hiérarchie hématopoïétique

#### I.3.a.i Chez la souris

L'hématopoïèse est généralement présentée comme un système hiérarchique dans lequel les CSHs se divisent de façon asymétrique ce qui permet de générer une cellule progénitrice immature elle-même capable de se diviser afin de générer in fine les différents lignages du sang. La progénie des CSHs perd la capacité d'auto-renouvellement et devient de plus en plus restreinte à un lignage hématopoïétique (**Figure 1A**).

Les travaux menés chez la souris ont permis de déchiffrer de mieux en mieux cet arbre hématopoïétique. M. Kondo et ses collègues ont défini en 1997 un progéniteur commun aux cellules lymphoïdes, nommé CLP (pour Common Lymphoid Progenitor) (**Figure 1A**). Celui-ci est caractérisé par l'expression de la chaîne  $\alpha$  de l'IL-7R (pour Interleukine 7 Récepteur) associé au phénotype  $\text{Lin}^- \text{Thy-1}^- \text{Sca-1}^{\text{low}} \text{c-Kit}^{\text{low}}$ . Ce progéniteur génère *in vitro* et *in vivo* uniquement des cellules lymphoïdes (Kondo et al., 1997). Il s'agirait du progéniteur le plus immature strictement restreint au lignage lymphoïde. K. Akashi et ses collègues ont caractérisé en 2000 le progéniteur myéloïde commun aux lignages myéloïdes, équivalent myéloïde du CLP, appelé CMP (pour Common Myeloid Progenitor) (**Figure 1A**). Ce progéniteur n'exprime pas l'IL-7R $\alpha$  et est défini par le phénotype  $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD34}^+ \text{Fc}\gamma\text{R}^{\text{low}}$ . Le CMP est capable de se différencier en progéniteurs restreints que sont les GMP (pour Granulocyte/Macrophage lineage-restricted Progenitor) et les MEP (pour Megakaryocyte/Erythrocyte lineage-restricted Progenitors) (Kondo et al., 1997) (**Figure 1A**).

### I.3.a.ii Chez l'homme

Parallèlement aux travaux effectués chez la souris, A. Galy et ses collègues identifient fonctionnellement en 1995 un progéniteur CLP humain, dans la MO adulte, qui se caractérise par les marqueurs suivant  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD45RA}^+ \text{CD10}^+$  (Galy et al., 1995). Ce progéniteur est capable de générer exclusivement des cellules lymphoïdes *in vitro* (lymphocytes B, NK et DC) et *in vivo* (lymphocytes T). Le CLP de A. Galy est également inefficace à générer *in vitro* les lignages myéloïdes et érythroïdes tout comme le lignage mégacaryocytaires. Les travaux d'A. Galy sont « étayés » par ceux de Q. L. Hao en 2001 qui identifie, dans les cellules de SCO, une population progénitrice clonogénique restreinte aux lignages lymphoïdes qui présente un phénotype  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD7}^+$  (Hao et al., 2001). Cependant, les auteurs de cette étude ne testent pas la capacité de ces progéniteurs à générer des lymphocytes T. Les deux populations cellulaires identifiées par A. Galy et Q. L. Hao sont considérées comme des CLP humains. En contrepartie, M. G. Manz et ses collègues identifient l'ensemble des progéniteurs myéloïdes (CMP ; GMP ; MEP) sur la base de l'expression des marqueurs IL-3R $\alpha$  et CD45RA chez l'homme en 2002 (Manz et al., 2002). Ces études qui définissent l'ensemble des progéniteurs hématopoïétiques humains sont en accord avec le modèle hiérarchique décrit précédemment chez la souris.

Les travaux menés par R. Majeti en 2007 définissent la population cellulaire MPP (pour MultiPotent Progenitors) isolée sur le profil  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD45RA}^- \text{CD90}^-$ . Cette population possède le potentiel de générer en souris immunodéficientes nouveau-nés des cellules lymphoïdes et myéloïdes dans le sang périphérique et la MO de la souris. La transplantation secondaire des cellules  $\text{CD34}^+$  issues de MO de la souris primaire transplantée avec la population MPP n'a pas permis de générer une prise de greffe aussi efficace que celle obtenue avec la population voisine CSHs avec respectivement 37,5% de prise de greffe contre 100%. Ce dernier résultat a permis de distinguer fonctionnellement les MPPs des CSHs (Majeti et al., 2007) (**Figure 1A**).

### I.3.b Vision actuelle de l'hématopoïèse

Depuis quelques années, grâce à l'avènement de nouvelles technologies et aux expériences menées à l'échelon unicellulaire, la vision classique/hiérarchique de l'hématopoïèse s'est améliorée. La vision de l'arbre hématopoïétique au cours duquel les progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes sont séparés précocement est quelque peu bouleversée tant chez la souris que chez l'homme.

J. Adolfsson (en 2005 chez la souris) ainsi que N. Goardon (en 2011 chez l'homme) définissent un nouvel acteur hématopoïétique, le progéniteur LMPP (pour Lymphoid-primed Multipotent Progenitors) (Adolfsson et al., 2005 ; Goardon et al., 2011). Celui-ci possède une forte capacité proliférative combinée à un potentiel restreint aux cellules lymphoïdes et myéloïdes mais ce progéniteur est incapable de générer des érythrocytes et/ou des mégacaryocytes. Il se caractérise chez la souris par l'expression des marqueurs  $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{CD34}^+$  associé à l'expression du FLT3 (pour Fms-like tyrosine kinase 3) et chez l'homme par le phénotype  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD45RA}^+$  (**Figure 1B**).

Avant même que le LMPP ne soit défini par N. Goardon, le laboratoire de J. E. Dick reprend en 2010 l'ensemble des populations progénitrices ainsi que les CSHs humaines afin de vérifier l'exactitude des informations générées antérieurement (Doulatov et al., 2010). Pour ce faire, son équipe effectue des co-cultures *in vitro* en contact avec les cellules stromales murines MS5 à l'échelon unicellulaire afin de caractériser le potentiel de différenciation des populations précédemment citées. Les résultats obtenus confirment que les cellules GMP sont dépourvues de capacité à générer des cellules érythroïdes *in vitro* contrairement aux progéniteurs plus immatures CMP. Ces résultats sont en accord avec le modèle hiérarchique classique (Doulatov et al., 2010). En revanche un résultat surprenant montre que les cellules GMP isolées à partir de SCO sont capables de générer *in vitro* des lymphocytes T. Dans un second temps, ce travail identifie une nouvelle population de cellules, appelées les MLP (pour Multi-Lymphoid Progenitor), plus primitive que les progéniteurs CLP, capables de générer des cellules lymphoïdes ainsi que **certaines** cellules du lignage myéloïde.

S. Doulatov et ses collègues caractérisent les MLP par le phénotype suivant :  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD90}^- \text{CD45RA}^+ \text{Flt3}^+ (\text{CD10}^+ \text{CD7}^{+/})$ . Les expériences qu'ils mènent *in vitro* montrent que les MLPs présentent un biais de différenciation macrophagique et un défaut de différenciation granulocytaire et érythrocytaire. En accord avec les données générées *in vitro*, la transplantation de cette population dans le fémur de souris immunodéficientes irradiées à dose sub-létale confirme leur capacité à générer à la fois des cellules lymphoïdes (B ;  $\text{CD19}^+$ ) et des cellules myéloïdes (monocytes  $\text{CD33}^+$  ;  $\text{CD14}$ ) (Doulatov et al., 2010).

Ces derniers résultats ouvrent une brèche quant à la réalité du modèle hématopoïétique classique comme nous le percevions jusqu'alors. Les expériences menées par F. Notta en 2016 montrent que les différentes populations de progéniteurs MPP, CMP et MEP se répartissent en 3 sous-populations (F1, F2, F3) selon l'expression des marqueurs  $\text{CD110}$  et  $\text{CD71}$  (F1 :  $\text{CD110}^- \text{CD71}^-$  ; F2 :  $\text{CD110}^- \text{CD71}^+$  ; F3 :  $\text{CD110}^+ \text{CD71}^+$ ) (Notta et al., 2016). La sous-population F3 des MPPs et CMPs présente un potentiel de différenciation

majoritairement érythroïde (voire exclusif pour la MEP). Cette nouvelle hiérarchisation semble apporter un degré supplémentaire d'hétérogénéité de potentiel des progéniteurs préalablement définis. En revanche, ces travaux montrent que la génération des mégacaryocytes au cours du vieillissement de l'hématopoïèse humaine est de moins en moins efficace via le progéniteur MEP mais sont durablement et principalement générés par les MPPs ou les CSHs (Notta et al., 2016). Cette étude rejoint également les observations faites quelques années plus tôt chez la souris (Yamamoto et al., 2013). F. Notta apporte la preuve que l'hématopoïèse néo-natale diffère dans sa hiérarchie de l'hématopoïèse adulte humaine. En effet, le progéniteur oligopotent MEP, devient chez l'homme adulte restreint à un seul type cellulaire. De plus, la population CMP est d'une part très hétérogène dans sa capacité de différenciation et semble présenter un potentiel de différenciation restreint et non oligopotent (Notta et al., 2016).

Les avancées technologiques et techniques des modèles d'études permettent de conforter ou critiquer les capacités de différenciation des progéniteurs jusqu'alors bien établis dans la littérature. Ainsi, grâce aux études fonctionnelles menées *in vivo* (greffe d'ossicules humanisées dans des souris immunodéficientes) et *in vitro* (co-culture à l'échelon clonal de cellules hématopoïétiques sur un stroma murin MS5 inductible pour l'expression du Delta Like 1 humain) (Calvo et al., 2012), D. Karamitros et ses collègues montrent l'existence d'un *continuum* de potentiel entre les LMPPs, les MLPs ainsi que les GMPs. Ce résultat fonctionnel est d'autre part prédit par l'analyse du transcriptome effectué à l'échelon unicellulaire des différentes cellules progénitrices (Karamitros et al., 2018). L'étude confirme que ces progéniteurs sont très hétérogènes dans leur capacité à se différencier, comme l'avait souligné F. Notta 2 ans auparavant. En effet, à l'échelon clonal *in vitro*, les LMPPs, les MLPs et les GMPs présentent une différenciation unipotente, ou bipotente mais une minorité de ces progéniteurs sont réellement multipotents (T/B/NK/My). Cette analyse répertorie ainsi jusqu'à 24 progéniteurs différents au sein de la population LMPP.

Enfin, J. Carrelha et ses collègues montrent en 2018 que le modèle hiérarchique classique défini depuis des années est à nuancer puisque les LT-CSHs de souris ( $Lin^- Sca-1^+ c-Kit^+ CD150^+ CD48^-$ ) présentent un biais plaquettaire probablement dû à un programme épigénétique. Malgré tout, la multipotentialité est retrouvée lorsque les LT-CSHs sont autrement sollicitées (Carrelha et al., 2018; Jacobsen and Nerlov, 2019). La plasticité des CSHs présentée par ces travaux finissent de mettre à jour l'arbre hématopoïétique.

Chaque nouveau modèle, plus permissif que le précédent, redessine un arbre hématopoïétique moins hiérarchisé que celui du début des années 2000. Bien évidemment,

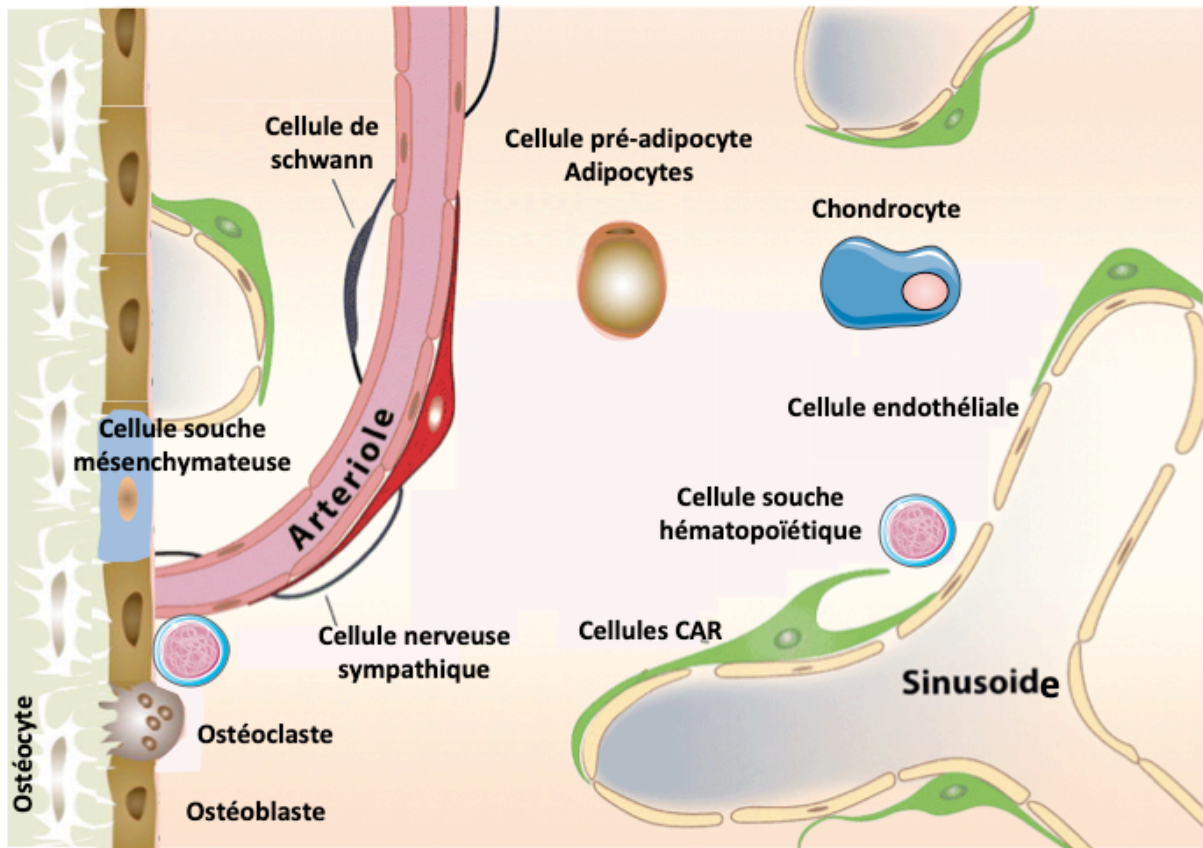


Figure 2 : Schéma de la composition cellulaire de la MO et localisation des Cellules Souches Hématopoïétiques dans les différentes niches médullaires. (adapté de Ding L. & Morrison S. J., 2013 ; Asada N. et al, 2017).

l'avènement du séquençage d'ARN à l'échelon de la cellule unique (Single Cell RNA Seq) offre une puissance inégalable et permet de définir de façon encore plus stricte l'ensemble de ces populations « souches/progénitrices », en atteste l'utilisation très récente d'un nouveau marqueur de surface des CSHs humaines, le CLEC9A (pour C-type Lectin domain family 9 member A). L'expression faible de CLEC9A discrimine une sous population des CSHs restreinte à la différenciation myélo-lymphoïde. Associé à cela, la fréquence des cellules capables à générer une hématopoïèse à long terme (20 semaines après transplantation) en souris immunodéficientes est nettement inférieure comparée à la population exprimant fortement ce même marqueur (Belluschi et al., 2018).

De façon évidente, l'arbre hématopoïétique hiérarchisé devient un *continuum* cellulaire (revue dans Laurenti and Göttgens, 2018). De plus, les cellules les plus primitives qui étaient strictement définies comme multipotentes sont finalement parfois restreintes à un lignage hématopoïétique. Les cellules progénitrices que l'on croyait restreintes ne sont finalement pas si exclusives les unes des autres au regard des nouveaux modèles expérimentaux. Il est à noter également que les modèles d'étude de transplantation *in vivo* ne permettent pas de rendre compte du comportement de la CSH dans une situation « steady state » (Jacobsen and Nerlov, 2019).

### I.3.c Composition de la MO

La MO est un tissu complexe, hétérogène et à forte densité cellulaire. Elle est composée d'éléments cellulaires, catégorisés en cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques, de composants non cellulaires tels que les protéines de la matrice extracellulaire (collagène fibronectine, laminine et acide hyaluronique (Zöller, 2015)) et des facteurs de croissance ou cytokines (Asada et al., 2017). C'est l'ensemble de ces composants qui assurent la régulation de la production des cellules sanguines et le maintien des CSHs en régulant leur quiescence, l'autorenouvellement, la survie, la prolifération et la différenciation (Anthony and Link, 2014).

Parmi les cellules hématopoïétiques matures on retrouve principalement des macrophages (Winkler et al., 2010), des neutrophiles (Casanova-Acebes et al., 2013), les lymphocytes B mémoires (Nuñez et al., 1996) et T régulatrices (Fujisaki et al., 2011). Les cellules non hématopoïétiques composent un soutien stromal parmi lesquelles on retrouve des Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSMs) (Méndez-Ferrer et al., 2010), des ostéoblastes et ostéoclastes (Asada et al., 2013), des fibroblastes, des cellules réticulaires, des adipocytes et des cellules endothéliales (Asada et al., 2017) (**Figure 2**).



Il y a deux types de niches hématopoïétiques : la niche endostéale qui est composée essentiellement d'ostéoblastes et d'ostéoclastes, elle est irriguée par des artérioles et la niche sinusoidale dans laquelle les CSHs sont proches de l'endothélium vasculaire (Calvi and Link, 2015).

En accord avec le sujet de ma thèse, je vais uniquement présenter la différenciation lymphocytaire T afin d'apporter des notions importantes pour la compréhension de la Leucémie Aiguë Lymphoblastique T.

## I.4 La lymphopoïèse T

### I.4.a Généralités

Contrairement aux autres lignées hématopoïétiques qui sont majoritairement générées dans la MO, la lymphopoïèse T se développe dans un organe épithélial spécialisé appelé « thymus ». Le thymus se développe pour atteindre sa taille et son activité maximale après la naissance puis involue progressivement au cours du vieillissement. Cette involution n'induit pas de problème de santé chez l'adulte en raison du maintien d'une fonction rudimentaire et de la proportion élevée de lymphocytes T mémoires. Le thymus correspond au site primaire de différenciation lymphocytaire T. La première étape de cette différenciation est la migration de cellules progénitrices lymphoïdes de la MO vers le thymus. Ces progéniteurs vont ensuite suivre une migration définie à l'intérieur de thymus au cours de laquelle, elles seront sensibles à de nouveaux stimuli induisant le programme restreint de différenciation lymphocytaire T. Ce programme leur fera perdre la potentialité de différenciation vers les autres lignages hématopoïétiques. La différenciation lymphocytaire T dans le thymus est divisée en plusieurs grandes étapes. Tout d'abord, les cellules progénitrices émanant de la MO sont communément décrites comme des cellules doubles négatives (DN) et vont générer les cellules doubles positives (DP) en référence à l'expression en surface des marqueurs CD4 et CD8. CD4 et CD8 sont des glycoprotéines transmembranaires qui se lient respectivement aux molécules du CMH (pour Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II et I des cellules présentatrices d'antigènes. Au stade DP, les thymocytes vont subir le réarrangement du TCR (pour T Cell Receptor) puis la sélection positive et négative pour enfin atteindre la dernière étape de maturation afin de générer les cellules simples positives (SP). Au cours de la différenciation, les cellules vont donc perdre/acquérir l'expression de marqueurs de surface spécifiques et subir le réarrangement des loci  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR. La voie conventionnelle de différenciation permet de générer des lymphocytes T TCR $\alpha\beta$  alors que la voie non



conventionnelle génère des lymphocytes T TCR $\gamma\delta$ . Seuls les lymphocytes T matures possédant un TCR fonctionnel (ne reconnaissant pas les antigènes du soi) seront au final sélectionnés puis migreront vers la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques). Les lymphocytes T se composent des lymphocytes T **naïfs** (qui ont la capacité de répondre à un nouvel antigène), les lymphocytes T **mémoires** (qui dérivent d'une activation par un antigène et maintient à long terme l'immunité) et les lymphocytes T **régulateurs** qui gardent la réponse immune sous contrôle.

Les lymphocytes T SP4 (exprimant CD4) sont appelés **auxiliaires** alors que les lymphocytes T SP8 (exprimant CD8) sont nommés **cytotoxiques**. La fixation des glycoprotéines CD4 et CD8 aux molécules du CMH (II ou I) stabilisent l'interaction du TCR à ces derniers. Le rapprochement des glycoprotéines CD4 ou CD8 au TCR via leurs interactions aux CMH engendre une cascade de phosphorylation activatrice qui permet, in fine, l'activation des lymphocytes T.

#### I.4.b Le thymus

Histologiquement le thymus est divisé en plusieurs zones que sont la médulla, le cortex et la jonction cortico-médullaire. C'est par cette dernière zone que les progéniteurs de la MO font leur entrée grâce au réseau vasculaire. Le thymus se compose de cellules épithéliales, nommées TECs (pour Thymus Epithelial Cells), mésenchymateuses, neuronales, endothéliales, dendritiques et de myocytes qui sont classiquement désignées comme des cellules dites « stromales », (Nitta and Suzuki, 2016; Petrie and Zúñiga-Pflücker, 2007). Au sein des TECs, deux types cellulaires se distinguent fonctionnellement, les cTECs qui composent le cortex et les mTECs retrouvées dans la médulla. L'ensemble de ces composants cellulaires coordonne l'architecture tridimensionnelle et moléculaire de la différenciation lymphocytaire T.

Ces constituants génèrent de multiples signaux qui vont guider la différenciation, la migration, la prolifération, la survie et la mort des thymocytes en développement. Les molécules d'adhésion, incluant la P-sélectine qui est exprimée par les cellules endothéliales du thymus, les chimiokines (Chimiokines C-C motif ligand : CCL21, CCL19, CCL25 ; Chimiokines C-X-C motif ligand : CXCL12), qui sont exprimés par les TECs, sont impliquées dans l'attraction des progéniteurs lymphoïdes T émanant de la MO. Ces progéniteurs vont aussi être exposés à de nombreux signaux extracellulaires tels que l'Interleukine 7, le Delta Like 4 (DL4 ; ligand du récepteur Notch1) tous deux fortement exprimés par les cTECs (Anderson and Takahama, 2012). Outre le DL4, il a été montré en

2011 que les autres ligands de NOTCH (DL1, JAGGED1 et JAGGED2) sont aussi exprimés par l'ensemble des TECs humains post nataux. Par ailleurs, les mTECs sont les seuls à exprimer de façon intense le ligand de NOTCH, JAGGED1 (Van de Walle et al., 2011).

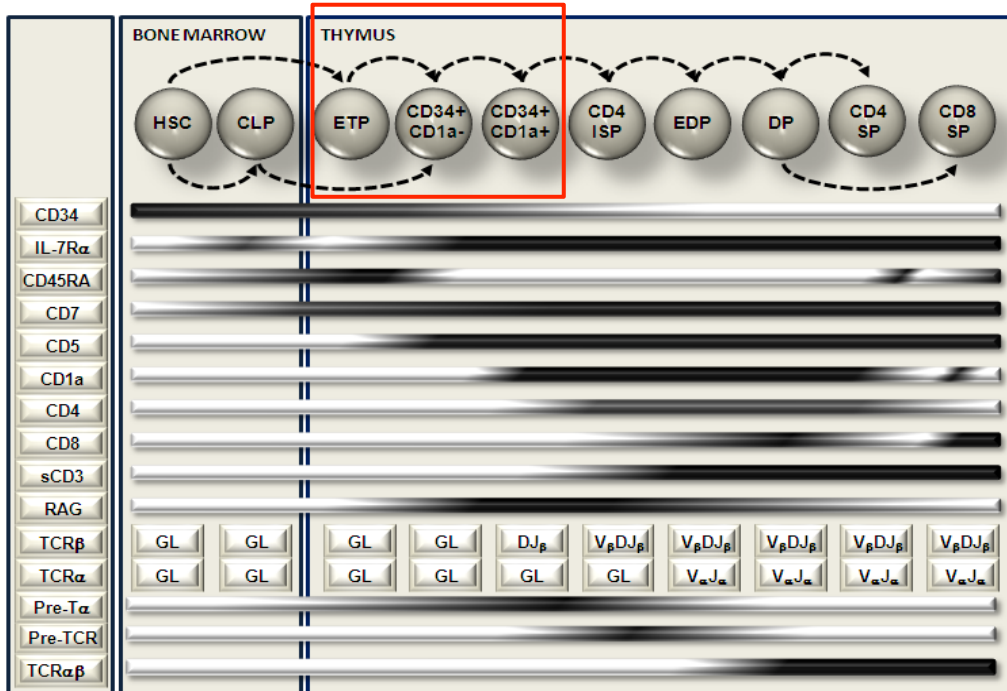
Une zone du thymus est bien caractérisée, il s'agit de la zone sous capsulaire qui est située au niveau du cortex. Elle est envahie par les thymocytes au stade DN3 et pré-DP pour lesquels les réarrangements de la chaîne  $\beta$  du TCR sont déjà bien engagés. La localisation des thymocytes dans cette région dépend de la sécrétion des chimiokines CCL25 et CXCL12. Les thymocytes qui expriment alors les récepteurs respectifs de ces chimiokines (CCR9 et CXCR4) sont attirés dans cette zone thymique pour s'expandre et poursuivre leur différenciation (Petrie and Zúñiga-Pflücker, 2007; Trampont et al., 2010). La migration des thymocytes vers la médulla est permise par l'expression renforcée du CCR7 à la surface des lymphocytes T qui seront attirés par les chimiokines CCL19 et CCL21 sécrétées par les mTECs (Nitta and Suzuki, 2016).

La question de l'identité des cellules qui vont coloniser le thymus reste débattue. Chez la souris il a été montré que les CSHs, les MPPs, les LMPPs ainsi que les CLPs placés directement dans un environnement thymique sont tous capables de générer des lymphocytes T. En revanche, aucune activité « souche » n'a été retrouvée dans l'ensemble des cellules isolées dans le thymus de souris, ce qui suggère que les CSHs ne figurent naturellement pas dans le thymus. De plus, seuls les LMPPs et les CLPs expriment à leur surface de façon concomitante les récepteurs des chimiokines CCL25 et CXCL12. Ces données laissent à penser que seuls ces deux progéniteurs ont la capacité de migrer vers le thymus (Love and Bhandoola, 2011). Chez l'homme, à la lumière des travaux menés par E. Six et ses collègues ainsi que R. Haddad et ses collègues, les progéniteurs humaines répondant au phénotype  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD10}^+ \text{CD24}^-$  qui résident dans la MO semblent répondre également à cette fonction (Six et al., 2007, Haddad et al., 2006).

Dès qu'un progéniteur réside dans le thymus, il est nommé TSP (pour Thymus Seeding Progenitor). Au cours de la différenciation, les TSPs vont perdre leur multipotentialité pour devenir strictement restreints au lignage lymphocytaire T.

#### I.4.c L'évolution de l'expression des marqueurs de surface

Chez l'homme, au cours de leur différenciation, les progéniteurs et les précurseurs vont acquérir ou perdre un certain nombre de marqueurs de surface (**Figure 3**). Les thymocytes les plus immatures expriment à leur surface le marqueur CD34. Celui-ci est

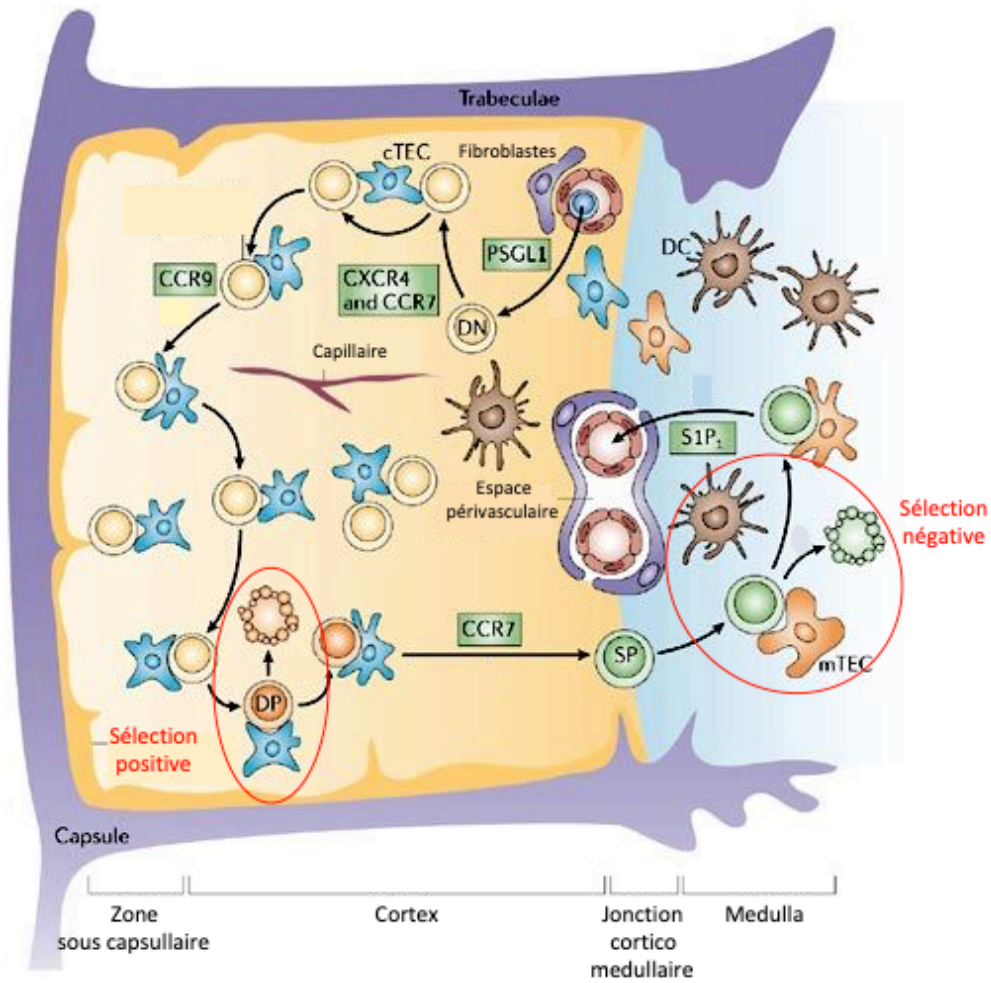


**Figure 3 : Représentation de l'acquisition et de la perte d'expression des molécules de surface des thymocytes au cours de la différenciation lymphocytaire T humaines.** Le carré rouge entoure les DN humains. (figure extraite du chapitre de livre « HIV host interactions » écrit par Blom Bianca en 2011).

graduellement perdu au cours de la différenciation lymphocytaire T. L'acquisition du marqueur CD7 précède la colonisation du thymus et signe l'engagement dans le lignage T (Haddad et al., 2006). Cet engagement vers le lignage lymphocytaire T n'est pas restreint puisque les progéniteurs de MO qui viennent d'acquérir l'expression du CD7 présentent encore la capacité à générer des cellules NK et des lymphocytes B (Haddad et al., 2004). Une fois dans le thymus, les progéniteurs vont acquérir le marqueur CD5 qui est exprimé spécifiquement par les cellules du lignage T. A ce stade, les précurseurs T expriment CD10 à leur surface et deviennent dépendants de l'IL-7. A mesure que les précurseurs T poursuivent leur différenciation, ils acquièrent le marqueur CD1a. Les thymocytes sont qualifiés de double-négatifs (DN) jusqu'au stade  $CD34^+ CD7^+ CD1a^+$  puisqu'ils n'expriment pas à leur surface les marqueurs de maturité CD4 et CD8. A titre de comparaison, les DN murins sont au nombre de 4 (DN1-4) alors que chez l'homme ne sont référencés que 3 DN (DN1-3). Les thymocytes au stade DN acquièrent ensuite l'expression de CD4 à la surface pour devenir des cellules ISP4 (pour Immature Single Positive CD4). Le stade suivant s'effectue au niveau de la jonction cortico-médullaire et correspond aux thymocytes DP (pour Double Positif), identifiés par la double expression en surface de CD4 et de CD8. L'expression du marqueur CD1a est perdue au stade DP mature. L'expression du marqueur CD3 reste intracytoplasmique jusqu'au stade mature DP où il s'exprime à la membrane de façon concomitante avec le  $TCR\alpha\beta$ . En fin de différenciation, on aboutit dans la médulla à la genèse des thymocytes matures simple-positifs (SP)  $CD4^+ ; CD8^-$  ou  $CD4^- ; CD8^+$  et au relargage des cellules matures dans le sang au niveau de la zone médullaire thymique (Blom and Spits, 2006).

#### I.4.d Réarrangements du $TCR\gamma$ , $\delta$ , $\beta$ et $\alpha$ et sélections thymiques

Les loci des  $TCR\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\beta$  et  $\alpha$  comprennent les segments des gènes variables (V), de jonction (J) et constants (C). Seul les loci du  $TCR\beta$  et  $TCR\delta$  contiennent en plus les segments des gènes de diversité (D). Afin de créer une grande diversité de récepteurs TCR à la surface des lymphocytes T, chaque locus est assemblé à la suite de réarrangements des segments de gène par un processus appelé « recombinaison V(D)J ». Le locus du  $TCR\delta$  étant situé dans le locus du  $TCR\alpha$ , les réarrangements de ce dernier résultent de la suppression du locus du  $TCR\delta$ . La recombinaison homologue est permise par le complexe RAG (pour Recombination Activating Gene) qui introduit des cassures doubles brins de l'ADN génomique en ciblant sélectivement les séquences de recombinaison (nommées RSS pour Recombination Signal Sequences) encadrantes les segments V, D et J (McBlane et al., 1995). Le complexe RAG est



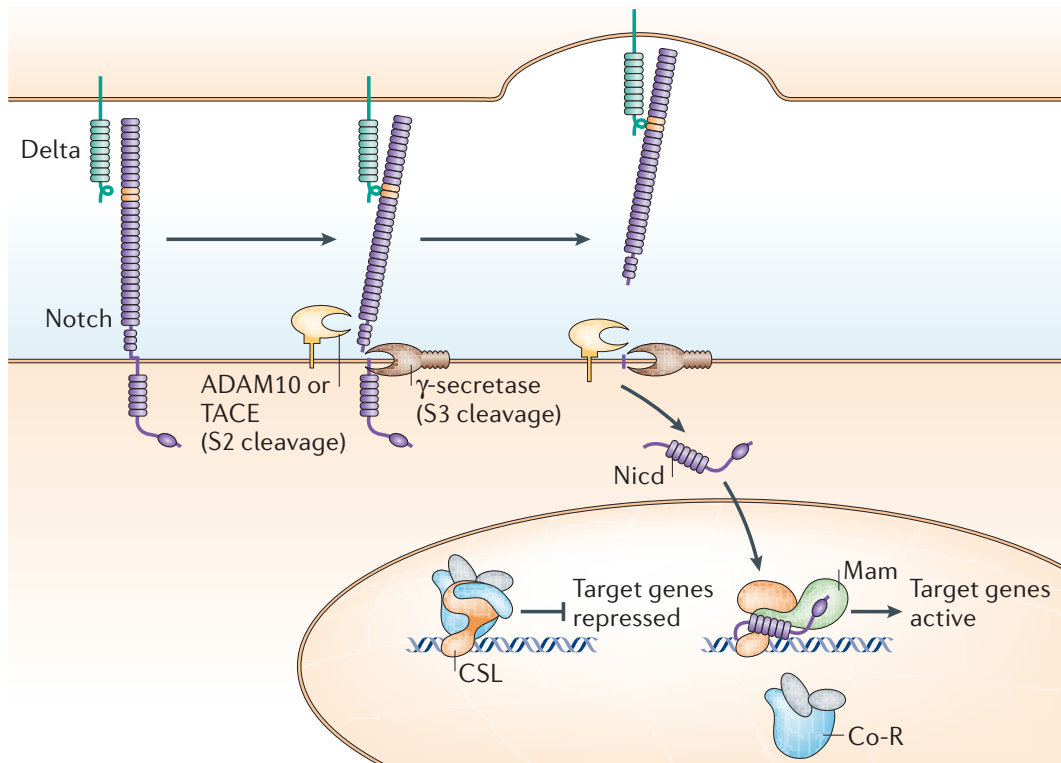
**Figure 4 : Représentation schématique de la différenciation lymphocytaire T intra-thymique.** Sont représentés les différents types cellulaires ainsi que les récepteurs clés impliqués dans la différenciation lymphocytaire T intra-thymique. Sont également indiqués les sélections positives et négatives entourées en rouge. (adapté de Takahama Y., 2006)

constitué des protéines RAG1 et RAG2. RAG2 stabilisent la liaison de RAG1 aux RSS. L'activité endonucléasique du complexe est assurée par RAG1 (Schatz D.G. & Swanson P.C., 2011). Les réparations des cassures s'effectuent par le mécanisme de recombinaison NHEJ (pour Non Homologous End Joining). Cette initiation des réarrangements s'induit très précocement dans les lymphocytes avant même l'acquisition du CD1a à la surface des lymphocytes (Canté-Barrett et al., 2017) (**Figure 3**).

Les premiers réarrangements que subissent les lymphocytes T au cours de la différenciation sont ceux des gènes codant la chaîne  $\gamma$  et  $\delta$  du TCR ou celui du gène codant la chaîne  $\beta$ . Ces réarrangements conduisent respectivement à la formation des lymphocytes T TCR $\gamma\delta$  ou des lymphocytes T pré-TCR (ce dernier associe la chaîne TCR $\beta$  réarrangée à la chaîne invariante pT $\alpha$ ). La pT $\alpha$  est une glycoprotéine membranaire qui s'associe au TCR $\beta$ . Le pré-TCR, associé au complexe CD3, constitue un signal suffisant pour induire l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8, l'exclusion allélique du second locus TCR $\beta$  ainsi que les réarrangements de la chaîne  $\alpha$  du TCR. Cette première étape est nommée la  **$\beta$ -sélection** puisque seuls les lymphocytes T possédant une chaîne  $\beta$  du TCR vont continuer leur différenciation. A l'issue du réarrangement du TCR $\alpha$ , sont générés à cette étape des lymphocytes T TCR $\alpha\beta^{\text{low}}$  CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (stade DP).

Les cTECs sont des cellules présentatrices d'antigènes, elles sont capables grâce au CMH (pour Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de présenter à leur surface des peptides du soi. Les TCR $\alpha\beta$  à la surface des lymphocytes T DP vont interagir avec le peptide du soi présenté à la surface du CMH. Seuls les lymphocytes T DP qui présentent une faible intensité d'activation du signal TCR $\alpha\beta$  pourront alors survivre. Cette étape qui se déroule dans le cortex et au cours de laquelle seulement 1 à 5% des cellules DP TCR $\alpha\beta^{\text{low}}$  survivent, correspond à la **sélection positive** (**Figure 4**). Dans le cas où le TCR $\alpha\beta$  ne rencontre pas d'antigène du soi présenté par le CMH ou induit une réponse trop importante lors de son interaction avec l'antigène du soi, les cellules DP TCR $\alpha\beta^{\text{low}}$  rentrent en apoptose (sélection négative). A cette étape précise, les cellules sélectionnées vont alors migrer vers la médulla. Associé à cette migration, les cellules DP vont devenir SP CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> TCR $\alpha\beta^{\text{high}}$  (SP4) ou CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta^{\text{high}}$  (SP8) (Klein et al., 2014; Love and Bhandoola, 2011).

Dans la médulla, les mTECs tout comme les cellules dendritiques thymiques vont présenter à leur surface des antigènes du soi tissu-spécifique. La reconnaissance avec une forte affinité de ces antigènes par les TCR $\alpha\beta^{\text{high}}$  entraîne alors l'apoptose cellulaire à cause de la sécrétion molécules co-stimulatrices (B7.1 et B7.2) par les mTECs ou les DC thymiques. Il s'agit de la **sélection négative efficace** (Kurd and Robey, 2016).



**Figure 5 : Schéma récapitulatif des clivages impliqués dans la voie de signalisation NOTCH.** Le ligand Delta lie le récepteur Notch. Un clivage intracellulaire intervient suivi d'un second en intracellulaire. Le dernier clivage libère le domaine intracellulaire de Notch (NICD) qui est transloqué dans le noyau. Dans le noyau, NICD recrute un ensemble de co-facteur afin d'activer la transcription de gènes cibles. (Figure extraite de Bray S. J. et al., 2006).



L'ensemble de ces étapes va permettre de générer des lymphocytes T matures naïfs qui sont disposés à quitter le thymus pour rejoindre la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires (Nitta and Suzuki, 2016) (**Figure 4**).

#### I.4.e Les protéines de la famille NOTCH

Les protéines NOTCH sont des récepteurs transmembranaires qui jouent un rôle clé à de nombreuses étapes de la différenciation lymphocytaire T. Cette famille de protéines est constituée de quatre récepteurs (NOTCH1-4) pour lesquels il existe 2 familles de ligands, la famille DSL (pour Delta Serrate Lag2) et la famille Delta Like (DL) dans laquelle on retrouve les DL1, 3 et 4 et les JAGGED 1 et 2. L'activation de la voie NOTCH se fait via la liaison du domaine extracellulaire du récepteur NOTCH aux ligands qui sont eux-mêmes des protéines transmembranaires. Ainsi cela implique l'interaction d'une cellule présentant le ligand avec une cellule présentant le récepteur (**Figure 5**). Lors de cette interaction, le domaine extracellulaire de NOTCH1 subit un changement de conformation ce qui rend disponible le site de clivage S2 aux métalloprotéases ADAM10 et ADAM17. Ce clivage induit un relâchement de la protéine en intracellulaire rendant accessible un autre site de clivage (S3) au complexe  $\gamma$ -sécrétase. Cette dernière étape enzymatique libère le domaine intracellulaire de NOTCH1 (ICN1 ; IntraCellulaire NOTCH1). ICN1 est transloqué dans le noyau et intègre un complexe transcriptionnel constitué des protéines CSL/RBPJ (pour Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region), des protéines de la famille des MAML (pour Mastermind like transcriptional co-activator) ainsi que d'autres co-activateurs transcriptionnels (**Figure 5**) (Bray, 2006). L'activation des gènes cibles de cette voie de signalisation est impliquée dans de nombreuses étapes de la différenciation lymphocytaire T.

Chez la souris, le fait de supprimer l'expression du DL4 strictement à la surface des TECs engendre l'apparition de lymphocytes B dans le thymus. Ces résultats montrent aussi que la différenciation du stade DN1 au stade DN2 requière la signalisation de NOTCH grâce à sa liaison au DL4 (Hozumi et al., 2008; Koch et al., 2008).

Chez l'homme également, la signalisation NOTCH1 est requise pour induire la spécification du lignage T puisque l'utilisation d'un inhibiteur spécifique du complexe enzymatique  $\gamma$ -sécrétase (GSI ; pour Gamma Secretase Inhibitor) (5  $\mu$ M) abolit *in vitro* la différenciation lymphocytaire T (Van de Walle et al., 2009, 2013). Les cellules qui présentent une activation de la voie NOTCH1 restent permissives au développement des cellules NK (Van de Walle et al., 2016), ce qui indique que l'activation de la signalisation NOTCH1 n'est

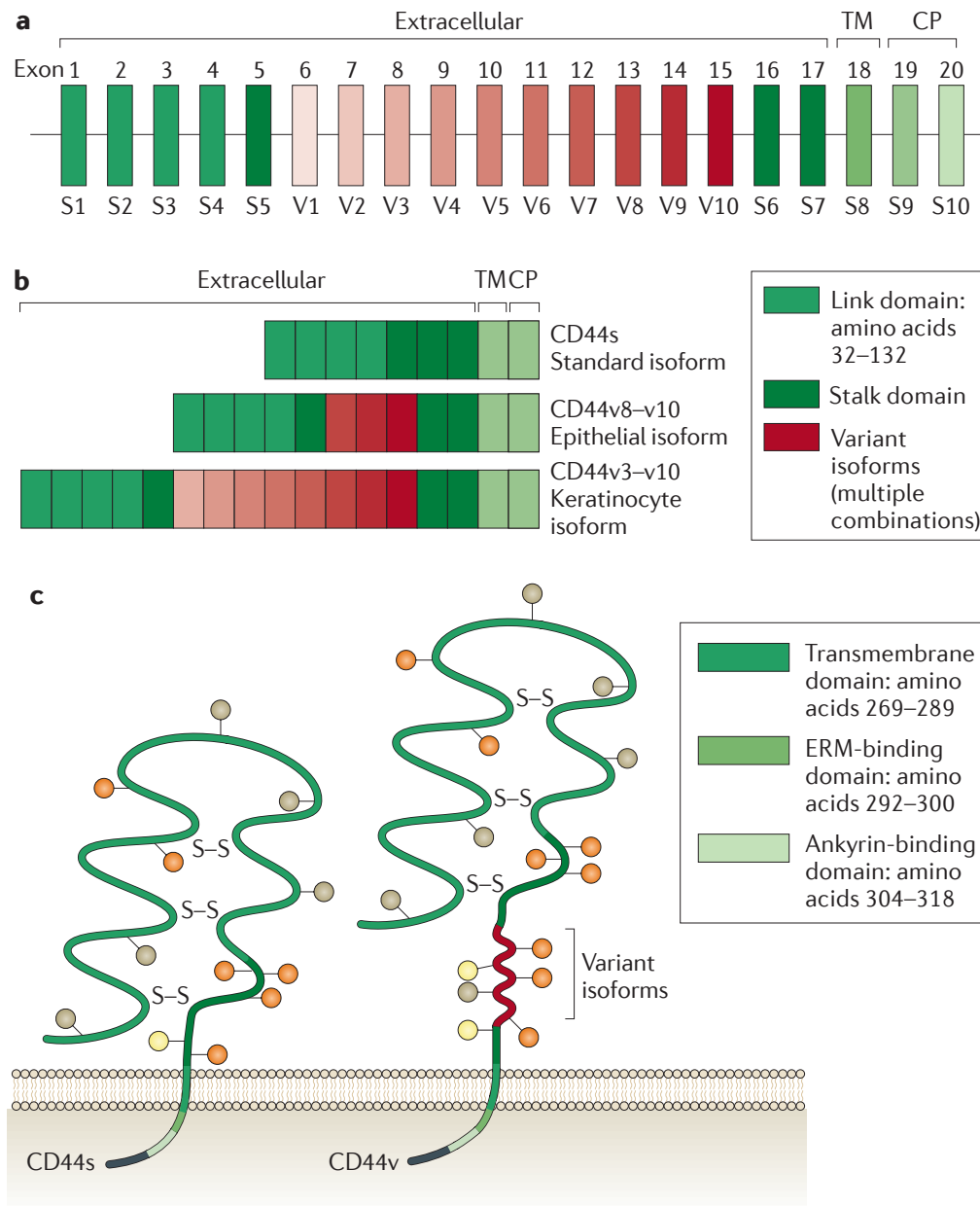


pas suffisante pour induire à elle seule la restriction au lignage T. Bien que l'induction de la spécification du lignage T soit fortement dépendante de la voie de signalisation NOTCH1 (Van de Walle et al., 2009; Waegemans et al., 2014), la diminution modérée de l'activation de la voie NOTCH1 *in vitro* améliore grandement la différenciation des lymphocytes T jusqu'au stade DP TCR $\alpha\beta$  (Taghon et al., 2009; Van de Walle et al., 2009). L'unité pT $\alpha$  qui constitue une sous-unité du pré-TCR est un gène cible de la voie de signalisation NOTCH, ainsi le facteur de transcription NOTCH1 clivé est nécessaire à la mise en place du pré-TCR.

Selon le ligand qui interagit avec le récepteur NOTCH, l'activation de la signalisation engendrée est plus ou moins intense et cela influe le choix de différenciation vers les lymphocytes TCR $\gamma\delta$  ou TCR $\alpha\beta$ . En effet, une forte activation de la signalisation NOTCH (liée à l'association JAG2/NOTCH3) promeut de façon biaisée le développement des lymphocytes T TCR $\gamma\delta$  tandis qu'une faible activation (liée à l'association JAG1/NOTCH1) tend à promouvoir la différenciation vers les lymphocytes T TCR $\alpha\beta$ . Enfin l'association du récepteur NOTCH1 au ligand DL4 permet le développement non biaisé des lymphocytes T TCR $\alpha\beta$  et TCR $\gamma\delta$  (Van de Walle et al., 2013).

Parallèlement à ces données élucidant le rôle de l'activation de la voie NOTCH strictement dans le thymus, une étude récente menée dans des modèles murins montre le rôle d'une niche spécifique de la MO pour cette même voie de signalisation. Les cellules progénitrices CLP, localisées dans la niche ostéoblastique de la MO sont activées pour la voie de signalisation NOTCH1 via le ligand DL4 présenté à la surface des ostéoblastes. La délétion spécifique des ostéoblastes, via un modèle de déplétion cellulaire *in vivo*, mène à la diminution du nombre absolu de progéniteurs CLP dans la MO. De plus, l'absence de signalisation NOTCH1 dans les CLP de la niche ostéoblastique conduit à la diminution de l'expression de surface du CCR7. Cet ensemble mène à un défaut de migration des CLP vers le thymus ce qui altère significativement la production en lymphocytes T (Yu et al., 2015). Les derniers travaux d'A. Aifantis ainsi que du laboratoire de D. Scadden, montrent que la source cellulaire essentielle de DL4 dans la MO est une population endothéliale des capillaires sinusoidales (Baryawno et al., 2019; Tikhonova et al., 2019). L'extinction d'expression du DL4 spécifiquement dans ce type cellulaire engendre une diminution de production des lymphocytes B ainsi qu'une diminution de la cellularité thymique expliquée par une altération du nombre de cellules ETP dans le thymus (Tikhonova et al., 2019). Ces travaux ne s'accordent pas sur la source originelle du DL4 dans la MO mais s'accorde sur le fait que l'activation de la voie NOTCH1 dans la MO est importante pour le devenir de la différenciation lymphocytaire T.

La différenciation lymphocytaire T est donc un processus finement régulé au cours de laquelle, la voie de signalisation NOTCH joue un rôle prépondérant. Son activation puis son inhibition convient à la différenciation lymphocytaire T et est même impliqué indirectement dans la capacité de migration des progéniteurs de la MO vers le thymus. Le dérèglement de cette voie présente un impact majeur dans l'hématopoïèse puisqu'il est source de blocage de la différenciation lymphocytaire T, lorsqu'il est absent, et est capable d'induire dans le modèle murin une leucémie aiguë lymphoblastique T, lors de l'augmentation de sa fonction ou de son expression (Aster et al., 2000).



**Figure 6 : Représentation de la conformation du CD44 du gène à la protéine. A.** Ensemble des exons du gène codant le CD44. **B.** Exemple d'ARNm codant le CD44s et deux CD44v après épissage alternatif. **C.** Conformation des protéines CD44s et CD44v. (Figure extraite de Zöllner M. et al., 2011).

## II. Les molécules impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire

Le processus de différenciation hématopoïétique fait intervenir un ensemble de chimiokines, de récepteurs à ces chimiokines, de molécules impliquées dans l'adhésion à la matrice extracellulaire ou intercellulaire. Ils sont essentiels à l'intégration de signaux du microenvironnement pour maintenir une hématopoïèse/thymopoïèse normale fonctionnelle. Que ce soit dans la colonisation du thymus ou dans la migration intra-thymique, la thymopoïèse est l'une des différenciations cellulaires les plus dépendantes des récepteurs aux chimiokines ou d'autres protéines impliquées dans l'adhésion à la matrice extracellulaire. Font référence le CCR7, le CXCR4, la P-sélectine, le CCR9 et le CD44. Dans ce manuscrit je vais me focaliser sur les protéines membranaires CD44 et CXCR4 que j'ai étudié au cours de ma thèse.

### II.1 Les protéines de la famille CD44

#### II.1.a Du gène à la protéine

La protéine CD44, aussi connue sous le nom de Pgp-1, ECM-III ou Hermes, est une glycoprotéine transmembranaire. Cette protéine est exprimée par un grand nombre de cellules humaines. Dans les années 90, il a été montré que le gène codant pour CD44 peut générer un grand nombre d'isoformes protéiques par **1)** épissage alternatif de l'ARNm et **2)** modifications post-traductionnelles de la protéine. Les exons constants retrouvés dans toutes les isoformes protéiques sont au nombre de 10 (c1 à c5 puis c16 à c20) (**Figure 6**). Les exons variables sont aussi au nombre de 10 (v1 à v10), leur présence dans l'ARNm après épissage engendre une modification uniquement du domaine extracellulaire de la protéine. L'épissage direct de l'exon constant 5 à l'exon 16 constitue la forme standard (la plus courte) de la protéine (**Figure 6**) (Zöller, 2011). La forme standard de CD44 (CD44s) a été originellement isolée à partir de cellules hématopoïétiques mais il est maintenant convenu que son expression est retrouvée à la surface de cellules de nombreux tissus tels que le système nerveux central, les poumons et l'épiderme. Quant aux autres isoformes du CD44 (CD44v), leur expression est restreinte à différents types cellulaires (kératinocytes, macrophages, certaines cellules épithéliales). Chaque isoforme peut conférer une fonction différente de celle de la forme standard. Enfin il est à noter que CD44 peut agir comme un facteur de transcription comme le font les protéines de la famille NOTCH. Le domaine intracellulaire du CD44 peut être clivé par le complexe enzymatique  $\gamma$ -sécrétase. Celui-ci est transloqué dans le noyau afin d'activer la transcription de nombreux gènes dont par exemple HAS-2 (pour Hyaluronic Acid Synthetase 2) et CD44 lui-même (Senbanjo and Chellaiah, 2017).

### II.1.b L'expression de la protéine CD44 au cours de la thymopoïèse.

En 1990, A. Aruffo et ses collègues ont montré que les lymphocytes de la circulation sanguine migrent sélectivement vers les tissus lymphatiques grâce à l'expression de CD44 via son adhésion à l'acide hyaluronique (composant de la matrice extracellulaire, MEC). Pour le montrer, A. Aruffo et ses collègues ont synthétisé des immunoglobulines fusionnées au domaine extracellulaire de CD44 afin d'en connaître ses ligands. Ces expériences ont montré que la protéine CD44 interagissait avec l'acide hyaluronique sécrétée à la surface des cellules endothéliales des ganglions lymphatiques, cette liaison étant abolie lorsqu'elle est spécifiquement traitée par l'hyaluronidase (Aruffo et al., 1990). L'ostéopontine, impliquée dans la minéralisation de l'os, est aussi un ligand de CD44. Dans la MO, l'ostéopontine est principalement sécrétée par les ostéoblastes (Sodek et al., 1995). Le chimiotactisme des cellules dépendant de l'ostéopontine est entre autre dû aux différentes isoformes de la protéine CD44. Ce mécanisme est d'ailleurs exploité par certaines tumeurs pour engendrer des métastases (Weber et al., 1996).

CD44 est l'un des premiers récepteurs de la MEC caractérisé dans le thymus et les variations d'expression sur les thymocytes coïncident avec la différenciation lymphocytaire T chez la souris (Ceredig et al., 1988). L'utilisation d'un anticorps bloquant anti-CD44, a permis de montrer que la protéine CD44 standard est impliquée dans la migration des précurseurs immatures thymiques vers le thymus (Rajasagi et al., 2009; Wu et al., 1993). Chez l'homme, la perte d'expression transcriptionnelle du CD44 est associée à la perte de présentation de la protéine à la surface membranaire. Au cours de la thymopoïèse, cette diminution d'expression marque l'engagement précoce et la spécification des lymphocytes T au stade DN. Son expression est remarquablement diminuée avant même l'apparition des premiers réarrangements de la chaîne  $\beta$  du TCR et de l'expression du marqueur CD1a à la surface des lymphocytes. K. Canté-Barret et ses collègues montrent *in vitro* que cette perte d'expression est directement liée à la perte de la multipotentialité et à la spécification lymphocytaire T des ETP. En revanche, en fin de différenciation et ce depuis le stade DP « mature » CD3<sup>+</sup> jusqu'aux stades SP4 et SP8, l'expression du CD44 devient de plus en plus intense (Canté-Barrett et al., 2017; Márquez et al., 1995).

Bien que cette observation soit intéressante, à ce jour aucune étude n'a pu montrer le mécanisme de régulation de la protéine CD44 au cours de la thymopoïèse. Il s'agit là d'une étude majeure puisque l'expression de la protéine CD44 n'est pas restreinte au développement

cellulaire normal, bon nombre de situations pathologiques aboutissent à l'expression aberrante de cette protéine standard et de ses variants.

### II.1.c Rôle de CD44 dans les tumeurs.

Différentes isoformes de la glycoprotéine CD44 ont été associées au potentiel métastatique de cancers. De ce fait, la détection de ces formes variables est parfois utilisée pour déceler le potentiel métastatique d'une tumeur mais ce procédé est aussi utilisé pour le diagnostic précoce de certains cancers tel que le cancer de la muqueuse gastrique, du pancréas, colorectal, les carcinomes des voies orales, les mélanomes, les cancers du sein...

La participation du CD44 dans les tumeurs a été largement décrite dans les cancers du sein. Par transplantation orthotopique de diverses sous populations phénotypiques, M. Al Hajj et ses collègues ont montré que seule la population CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> était capable de générer des tumeurs dans des souris immunodéficientes. Depuis l'identification de cette population de cellules souches du cancer du sein (CSCS), de nombreuses études ont cherché à comprendre le rôle des protéines CD44 détectées dans cette pathologie. Alors que l'augmentation d'expression du CD44s est corrélée avec une meilleure survie des patients, l'expression des variants v3, v7-v8 sont plutôt des facteurs de mauvais pronostics. L'inhibition d'interaction du CD44s avec l'acide hyaluronique augmente l'invasion tumorale alors que cette même stratégie vis à vis du CD44v3 inhibe la migration des cellules métastatiques. Malgré tout, le couplage de médicaments chimio-thérapeutiques conventionnels avec l'acide hyaluronique permet de cibler les cancers exprimant CD44, réduisant ainsi les doses de médicaments anticancéreux administrées et réduisant les effets secondaires indésirables (Götte and Yip, 2006). Les différentes isoformes ont donc des rôles parfois opposés dans le cancer du sein. Seul l'expression du CD44s est associée au caractère souche des CSCS. La perte d'expression de ce dernier au profit des autres variants entraîne la perte de fonction des CSCS. Dans le cas inverse, la modification d'épissage du CD44v au profit du CD44s mène à l'induction des propriétés des CSCS. L'épissage alternatif offre une versatilité de fonction et est essentiel pour distinguer les états des cellules cancéreuses (Zhang et al., 2019).

Récemment, il a été montré que la forte expression de CD44 à la surface des cellules humaines de carcinome est associée à une progression lente dans le cycle cellulaire. Ces cellules présentent un métabolisme modifié puisque les auteurs de cette étude constatent une augmentation de l'assimilation des lipides induite par l'augmentation d'expression du principal récepteur/transporteur des acides gras, le CD36. CD36, aussi connu sous le nom de FAT (pour Fatty Acid Translocase) ou SCARB3 (pour Scavenger Receptor class B member

3) est une glycoprotéine possédant deux régions transmembranaires qui forme un large tunnel hydrophobique concentrée au niveau d'invaginations de la membrane cytoplasmique nommées cavéoles. L'initiation d'un régime gras des souris transplantées en orthotopique avec ce carcinome humain des voies orales augmente le pouvoir métastatique de façon dépendante du CD36 (Pascual et al., 2017). Cette étude est pionnière dans le lien entre métabolisme, progression du cycle cellulaire et pouvoir métastatique. Le transport des acides gras par le CD36 pourrait représenter une cible thérapeutique contre les cellules initiatrices de métastases. Mais les auteurs ne montrent pas spécifiquement comment la forte expression de la protéine CD44 entraîne moléculairement l'augmentation de l'assimilation des lipides dans ce modèle. Ce lien nécessite donc d'être investi plus en profondeur.

De nombreux chercheurs se sont également intéressés aux rôles de la protéine CD44 dans les hémopathies. En effet, D. Krause et ses collaborateurs montrent en 2006, dans un modèle strictement murin, que CD44 est nécessaire à la capacité des cellules initiatrices de Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) à migrer vers la MO. La capacité de greffe de ces cellules ainsi que la progression de la maladie dans ce modèle sont totalement réduites lorsque les cellules initiatrices de LMC sont déficientes en protéine CD44. Ce résultat n'est pas retrouvé avec les cellules de LAL-B (pour Leucémie Aigüe Lymphoblastique B) induites par la fusion oncogénique BCR-ABL (Rowley et al., 1973; Krause et al., 2006). Il semble donc que ce phénotype soit dépendant du modèle de pathologie étudiée. Le rôle de CD44 est aussi décrit dans une autre hémopathie, les LAM (pour Leucémie Aigüe Myéloïde). Les LAM expriment fortement certains variants de la protéine CD44 et cela est associé à un mauvais pronostic pour le patient. Le laboratoire de F. Smadja-Joffe associé à celui de J. E. Dick a montré que l'utilisation d'un anticorps monoclonal (H90) activateur de CD44 réduisait spécifiquement la capacité de transplantation des échantillons de LAM en souris en ciblant les cellules initiatrices de LAM par l'activation de la signalisation dépendante de CD44 (Jin et al., 2006). Comme pour l'étude de D. Krause, ce travail montre que la capacité de migration des cellules leucémiques de LAM est altérée lorsqu'elles sont pré-incubées avec l'anticorps anti-CD44. Dans ces deux études, le mécanisme impliqué semble être lié à l'altération de la liaison au ligand principal de CD44 qu'est l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est d'ailleurs largement retrouvé dans la MO.

Au regard de ces études, il semble que l'expression du CD44 conditionne la capacité de migration des cellules leucémiques vers la MO. Une récente étude a également montré que l'augmentation d'expression du CD44 est étroitement liée à la dormance de lignées cellulaires leucémiques de LAM (Al-Asadi et al., 2017).



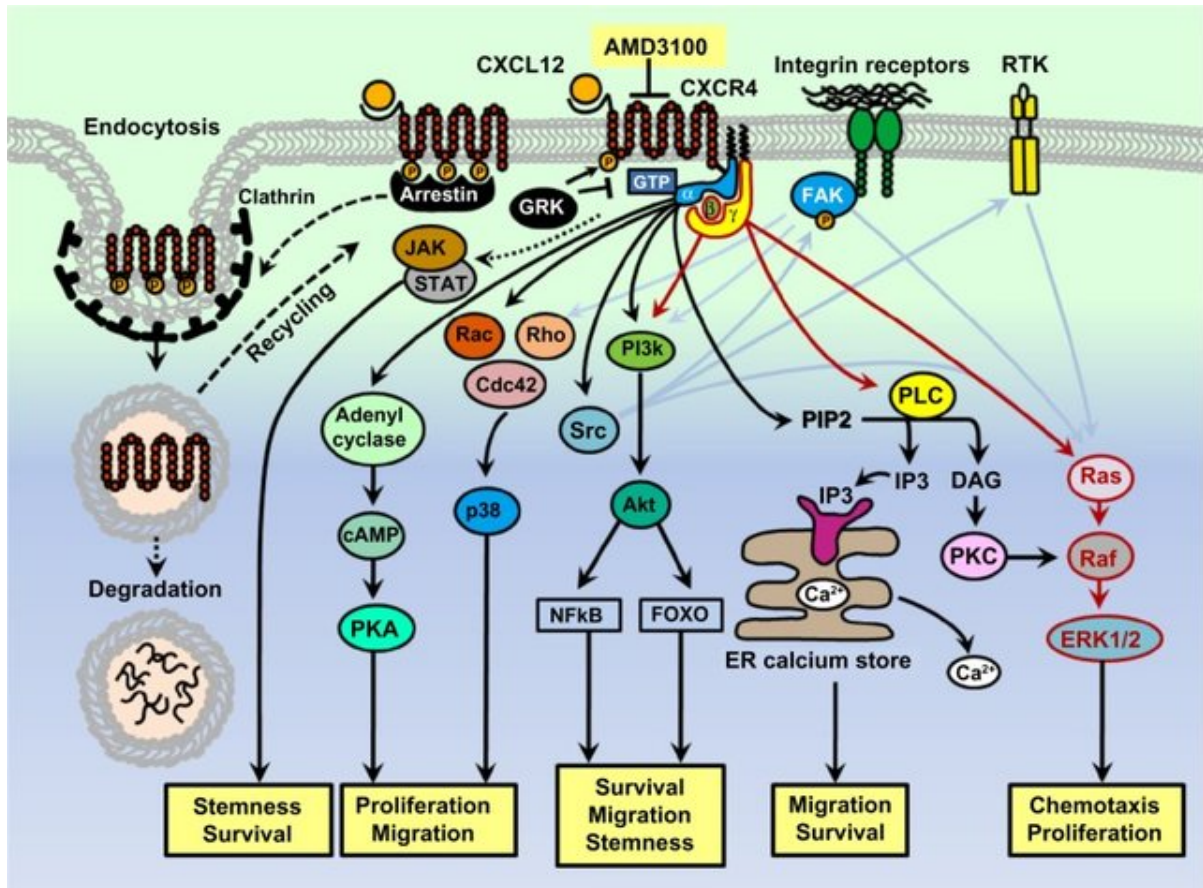


Figure 7 : Voies de signalisation activées suite à l'interaction de la chimiokine CXCL12 au récepteur CXCR4. (Figure extraite de Cojoc M. et al., 2013).



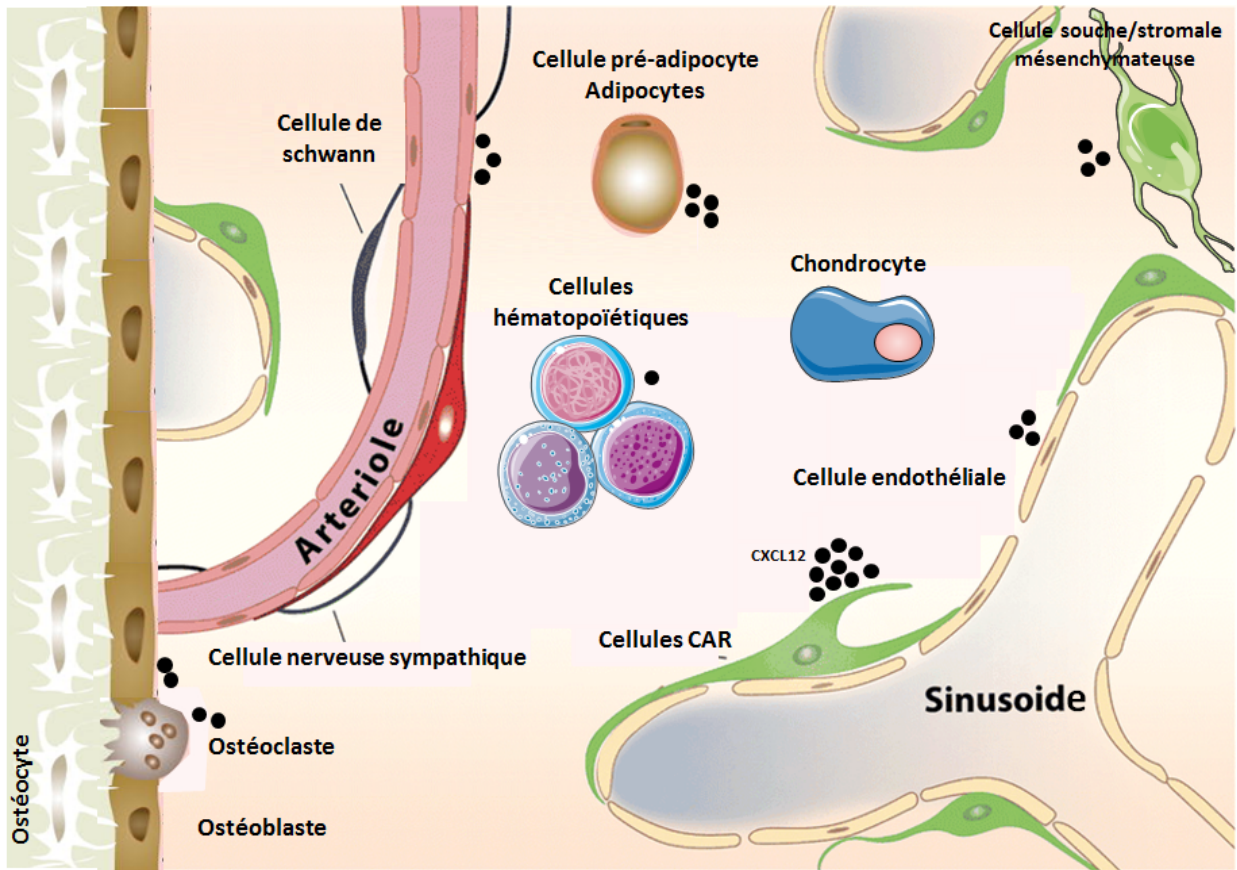
Le rôle de l'expression de la protéine CD44 à la surface des cellules leucémiques de LAL-T (pour Leucémie Aigüe Lymphoblastique T) humaine a également été étudié. Bien que l'expression de la protéine CD44 à la surface des cellules leucémiques de patients atteints de LAL-T est globalement moins importante que ceux atteints de LAM, aucune LAL-T ne semble être négative pour ce marqueur. Son expression est aberrante et ne semble pas être associée à un sous type de LAL-T ou à un oncogène défini (Marques et al., 2018).

A la lumière de ces données bibliographiques, cibler les cellules initiatrices de leucémies et/ou les cellules « dormantes » par l'intermédiaire de la molécule d'adhésion CD44 pourrait représenter un enjeu majeur dans les différentes hémopathies.

## II.2 La voie de signalisation CXCR4

### II.2.a Le récepteur et son ligand le CXCL12

Les chimiokines sont des peptides de 8 à 12 kDa qui fonctionnent comme des cytokines chimioattractantes et sont impliquées dans l'activation, la différenciation et la migration cellulaire. La plupart des chimiokines peuvent lier de multiples récepteurs, et le même récepteur peut interagir avec plusieurs ligands. La chimiokine CXCL12 ou nommée SDF-1 (pour Stroma cell Derived Factor-1) possède un motif CXC. Les chimiokines au motif CXC sont nommées ainsi parce qu'elles présentent deux cystéines séparées par un acide aminé quelconque nommé X. La chimiokine CXCL12 lie deux récepteurs que sont les protéines CXCR7 et CXCR4. La protéine CXCR4 est un récepteur possédant 7 régions transmembranaires et un domaine intracellulaire couplé à des protéines G. Ce récepteur a tout d'abord été décrit pour son rôle comme co-récepteur du VIH-1, responsable du Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquise (Feng et al., 1996). La liaison de CXCL12 au récepteur CXCR4 induit, par l'intermédiaire des protéines G auxquels il est couplé, différentes cascades de signalisation qui vont permettre la migration, la survie et la prolifération cellulaire. Suite à la liaison de CXCR4 à son ligand, le domaine intracellulaire de CXCR4 peut se retrouver phosphorylé permettant le recrutement des protéines  $\beta$ -arrestines. Cette association permet la dégradation du complexe CXCR4/ligand par le protéasome ou le recyclage du récepteur suite à son internalisation et parallèlement empêche toute activation via les protéines-G (**Figure 7**) (Cojoc et al., 2013). Les modèles de souris dans lesquels le récepteur CXCR4 ou le ligand CXCL12 sont invalidés présentent un défaut hématopoïétique à cause d'un défaut de migration des CSHs du foie fœtal (origine de l'hématopoïèse embryonnaire) vers la MO de l'embryon. Ces souris présentent aussi un défaut majeur du développement du cerveau, du cœur ainsi que de la vascularisation.



**Figure 8 : Représentation schématique des différences d'expressions du CXCL12 (point noir) par les constituants cellulaires de la MO.** Sont représentés sans distinction les expressions géniques et protéiques. (adapté de Ding L. & Morrison S. J., 2013 ; Greenbaum A. et al., 2013 ; Tikhonova A. N. et al., 2019 ; Asada N. et al., 2017).

## II.2.b Quelles sont les cellules sécrétrices du CXCL12 dans la MO ?

De nombreuses cellules qui composent la MO sécrètent le CXCL12. Les sources cellulaires de sécrétion de CXCL12 dans le microenvironnement médullaire sont : les cellules hématopoïétiques, les ostéoblastes, les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires CAR (pour CXCL12-Abundant Reticular cells) (Ding and Morrison, 2013; Greenbaum et al., 2013). L'origine des cellules CAR est débattue. Pour certains laboratoires, ces cellules sont définies par l'expression de la Nestine (Méndez-Ferrer et al., 2010), pour d'autre par l'expression du récepteur de la Leptine, le LepR (Ding and Morrison, 2013) et du PDGFR- $\alpha$  (pour Platelet-derived growth factor receptor). Le blocage de différenciation des cellules CAR en ostéoblastes et adipocytes tend à considérer ces cellules comme une sous-fraction des CSMs (Seike et al., 2018). L'identité des cellules CAR reste donc à définir avec exactitude. Très récemment, les analyses de séquençage des ARNs à l'échelon de la cellule unique confirment que les cellules mésenchymateuses exprimant le Récepteur à la Leptine sont les cellules qui expriment le plus fortement *Cxcl12* (Baryawno et al., 2019; Tikhonova et al., 2019). Ces cellules n'expriment pas la Nestine. N. Baryawno et ses collègues identifient un cluster composé de cellules mésenchymateuses périvasculaires et de péricytes. Dans ce cluster se retrouve une population cellulaire qui présente une signature transcriptomique comparable aux cellules CAR Nestine<sup>+</sup> (Méndez-Ferrer et al., 2010). Contrairement aux cellules mésenchymateuses LepR<sup>+</sup>, les cellules Nestine<sup>+</sup> n'expriment pas conjointement *Cxcl12* et *Scf* (Baryawno et al., 2019). Il semble donc que les cellules LepR<sup>+</sup> et Nestine<sup>+</sup> caractérisent deux populations moléculairement différentes. La population LepR<sup>+</sup> semble correspondre aux cellules CAR.

Enfin ces études ont montré également qu'une partie des cellules vasculaires (artérielles ou sinusoidales) et des ostéoblastes expriment cette chimiokine (Baryawno et al., 2019; Tikhonova et al., 2019). Bien qu'il s'agisse uniquement d'expression génique, ces analyses d'expressions génique confortent les précédentes études fonctionnelles (Ding and Morrison, 2013; Greenbaum et al., 2013).

Un grand nombre de cellules composant la MO sécrètent CXCL12 mais à des niveaux totalement différents (**Figure 8**). Comme mentionné dans les études fonctionnelles, le phénotype qu'induit la suppression d'expression de *Cxcl12* dans les cellules stromales sur l'hématopoïèse diffère selon la cellule ciblée (Ding and Morrison, 2013; Greenbaum et al., 2013).

### II.2.c Implication du récepteur CXCR4 dans l'hématopoïèse

CXCL12 est une chimiokine clé pour la maintenance des CSHs dans la niche médullaire. L'étude de l'hématopoïèse de souris a apporté de grandes connaissances dans ce domaine. Le lien CXCL12 / CXCR4 est essentiel pour la colonisation hématopoïétique de la MO ainsi que la maintenance des CSHs et des progéniteurs dans leurs niches respectives. En effet, la suppression d'expression du CXCL12 dans les cellules endothéliales épuise le stock des CSHs dans la MO (Ding and Morrison, 2013). De plus, la signalisation par CXCR4 est requise pour maintenir la quiescence à travers la régulation des gènes du cycle cellulaire dans les CSHs (Wei and Frenette, 2018). Il a été montré également que la lymphopoïèse B est dépendante du lien CXCR4 à son ligand puisqu'il contrôle dans la MO le positionnement des progéniteurs les plus précoces engagés vers le lignage lymphoïde B (Cordeiro Gomes et al., 2016).

L'AMD 3100 (Plerixafor ou Mozobil) anciennement nommé JM 3100 est une molécule chimique qui se lie spécifiquement sur certains résidus d'acide aspartique à la jonction entre les segments transmembranaires et le domaine extra-cellulaire de CXCR4. En se fixant au CXCR4, l'AMD 3100 inhibe le chimiotactisme et la signalisation induite par la liaison du récepteur au CXCL12 (De Clercq, 2003). L'inhibition *in vivo* de ce chimiotactisme induit la mobilisation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques. L'administration de l'AMD 3100 est couramment associé au facteur de croissance G-CSF (pour Granulocyte-Colony Stimulating Factor) pour mobiliser plus efficacement les CSPHs de patients candidats à une auto-greffe post-chimiothérapie (Flomenberg et al., 2005). L'administration du G-CSF entraîne la sécrétion de la métalloprotéase MMP9 (pour Matric Metallopeptidase 9) et l'élastase (une enzyme protéolytique) par les neutrophiles. Ces enzymes sont responsables de la dégradation du CXCL12 dans la MO et participent de ce fait à l'augmentation de la mobilisation des CSPHs des patients (Jin et al., 2008; Petit et al., 2002).

Bien que cette combinaison soit efficace, il reste néanmoins un certain nombre de patients qui présentent une mobilisation trop faible des CSPHs. Différentes équipes proposent des alternatives associant toujours l'AMD 3100 à d'autres molécules, par exemple la forme tronquée de la chimiokine GRO $\beta$ , un activateur du récepteur CXCR2 (Hoggatt et al., 2018). Le CXCR2 est l'un des récepteurs de la chimiokine CXCL8, il est exprimé entre autre par les neutrophiles. La combinaison AMD 3100 avec la forme tronquée de GRO $\beta$  offre une plus grande rapidité de mobilisation des CSPHs via une importante perméabilité des vaisseaux

sanguins. Cette perméabilité est dépendante de la métalloprotéase MMP9 sécrétée par les neutrophiles sous l'effet de ces drogues (Hoggatt et al., 2018).

D'un point de vue thymopoïèse, il a été montré que l'entrée et le positionnement des thymocytes dans le thymus sont régulés par différentes chimiokines associées à leurs récepteurs. A ce titre, CXCR4 est primordial pour l'invasion du thymus par les ETP (Cordeiro Gomes et al., 2016). Comme décrit précédemment, la migration intra-thymique orchestre la différenciation lymphocytaire T. Le chimiotactisme de CXCL12 régule la localisation des thymocytes DN3 dans la zone sous-capsulaire (ZSC) du thymus. Dans un second temps, la signalisation induite par la liaison du CXCL12 à CXCR4 régule la différenciation/maturation des thymocytes de souris du stade DN3 au stade DN4. Le signal de survie généré par la signalisation du récepteur CXCR4 est essentiel à l'efficacité de la  $\beta$ -sélection via le pré-TCR (Tramont et al., 2010). Enfin, suite à la sélection positive des thymocytes « matures » dans le thymus, ces derniers diminuent l'expression de la protéine CXCR4 et augmentent parallèlement l'expression du récepteur CCR7 afin de continuer leur migration intra-thymique dans la medulla (Passaro et al., 2016, Nitta et al., 2016).

Le chimiotactisme ainsi que la signalisation permise par la liaison de CXCR4 à CXCL12 sont bien démontrés dans l'hématopoïèse normale mais cette interaction est tout aussi étudiée voir importante dans un contexte pathologique.

#### II.2.d Participation du récepteur CXCR4 à la progression tumorale

La liaison de CXCL12 à CXCR4 joue aussi un rôle important dans divers cancers en agissant directement sur la croissance tumorale, en favorisant les métastases, en favorisant la mise en place du microenvironnement tumoral mais aussi à travers son implication dans l'angiogenèse (Domanska et al., 2013).

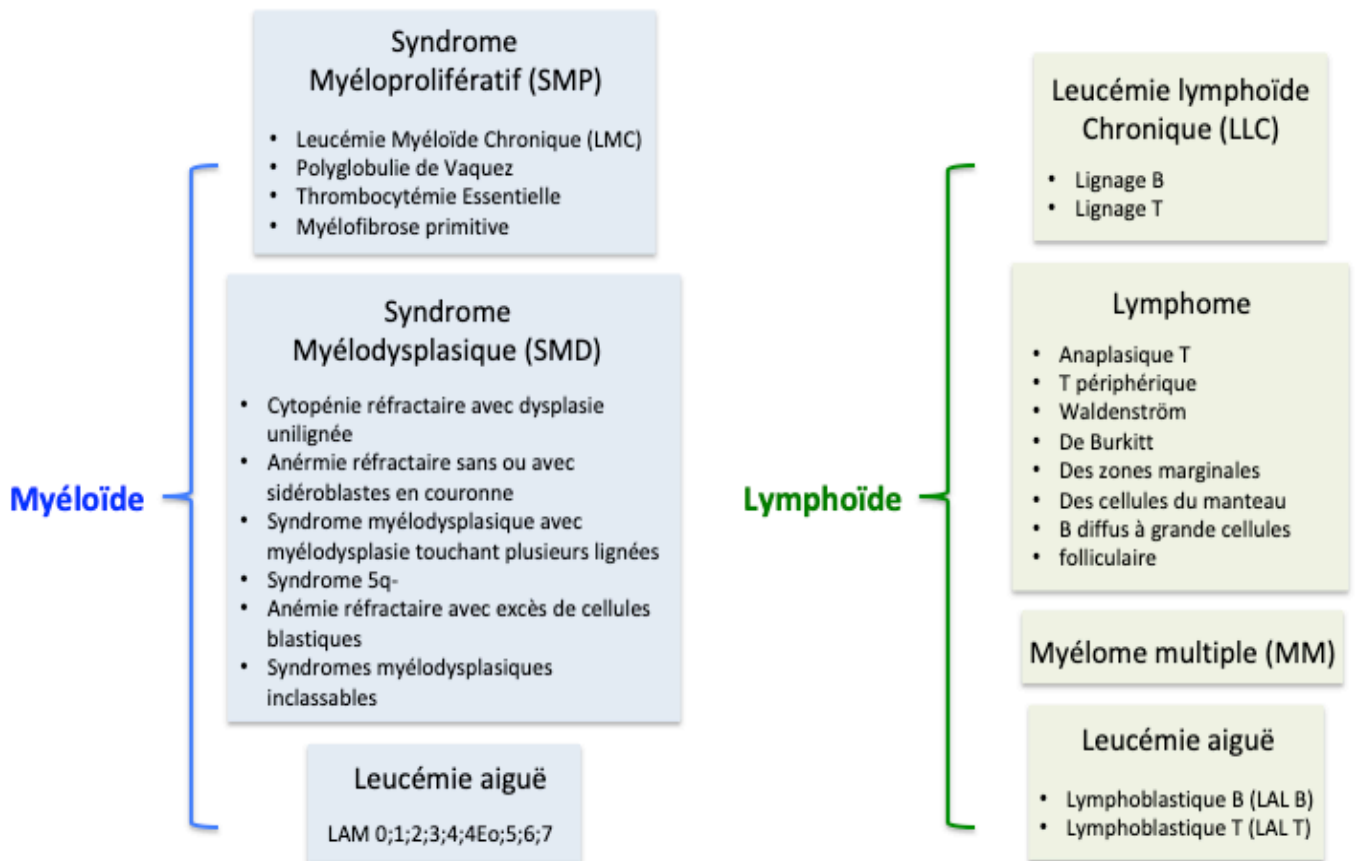
Effectivement, la sur-expression de CXCR4 est connue pour favoriser la croissance tumorale. L'utilisation d'un inhibiteur de l'interaction protéique CXCR4/CXCL12 induit une diminution d'expansion de cellules tumorales dans différents modèles *in vivo* (greffe orthotopique, xenogreffe de cellules tumorales humaines et souris transgéniques). D'autre part, l'utilisation de modèles pré-cliniques de métastases montre que certaines cellules tumorales sont dépendantes de l'activation du CXCR4 pour effectuer leur migration vers des organes exprimant fortement le ligand CXCL12 (MO, foie, poumons, les ganglions lymphatiques) (Domanska et al., 2013).

Une méta-analyse montre que l'expression aberrante et intense de CXCR4 est significativement associée à une plus faible survie globale ou sans progression des patients quelque soit le type de cancer analysé (Zhao et al., 2015).

Dans les hémopathies, l'expression de CXCR4 confère aux cellules leucémiques une plus forte capacité à migrer vers la MO ce qui entraîne, pour bon nombre d'entre elles, une protection contre l'apoptose induite par les agents utilisés en chimiothérapie (Peled et al., 2018).

Différents essais cliniques ont été menés en associant l'AMD 3100 à une chimiothérapie conventionnelle sur des patients réfractaires ou présentant une rechute d'hémopathies. Les résultats obtenus sont d'ailleurs très encourageants pour certaines LAM (pour Leucémie Aiguë Myéloïde) et Myélomes Multiples (MM) (Peled et al., 2018). Les cellules leucémiques de LLC (pour Leucémie Lymphoblastique Chronique) présentent elle aussi une forte expression de CXCR4 à la surface des cellules leucémiques mais contrairement aux LAM et aux MM, cette expression n'est pas un facteur de pronostic. Enfin, il a été montré dans des LAL-B (pour Leucémie Aigue Lymphoblastique B) que l'augmentation d'expression du CXCR4 à la surface des cellules leucémiques survivantes à la chimiothérapie était responsable de la résistance thérapeutique (Peled et al., 2018). Concernant les LAL-T, il a été montré que l'interaction CXCR4/CXCL12 est essentielle dans la tumorigenèse de la pathologie mais je traiterai plus spécifiquement ce sujet dans le **paragraphe IV.7.a** de mon manuscrit.

Il semble donc que le CXCR4 gouverne autant le devenir des cellules leucémiques que le développement normal de l'hématopoïèse.



**Figure 9 : Les hémopathies représentées selon les classifications de l’OMS.** En bleu les hémopathies affectant le lignage myéloïde et en vert les hémopathies du lignage lymphoïdes.



### III. Hémopathies malignes

L'hématopoïèse est un processus finement régulé. Son dérèglement peut aboutir à la genèse d'hémopathies malignes. Ce terme générique regroupe de nombreux syndromes qui affectent soit les cellules du lignage myéloïde, soit celles du lignage lymphoïde.

Dans le lignage myéloïde sont répertoriés les syndromes myéloprolifératifs, myélodysplasiques et les leucémies aiguës (**Figure 9**). Les syndromes myéloprolifératifs sont caractérisés par une prolifération aberrante d'une ou plusieurs lignées sans blocage de la différenciation au contraire des syndromes myélodysplasiques qui présentent des anomalies de différenciation et dont l'expansion est strictement médullaire. La leucémie aiguë est définie par la prolifération anarchique d'une cellule bloquée dans sa différenciation. Ces éléments expliquent les principaux signes biologiques que l'on observe chez les patients. Dans les syndromes myéloprolifératifs on observe une augmentation des cellules sanguines « normales » tandis que les syndromes myélodysplasiques se caractérisent par une diminution de ces cellules dans le sang contrastant avec une cellularité importante dans la MO. Enfin les cellules des leucémies aiguës envahissent la circulation sanguine et souvent la MO.

Dans le lignage lymphoïde on distingue les proliférations aberrantes de cellules émanant des lignées lymphoïdes B et T. Comme pour le lignage myéloïde, on distingue les proliférations affectant des cellules matures tel que les lymphomes B et T, ou des cellules immatures telles que les leucémies aiguës lymphoblastiques (**Figure 9**).

Les leucémies aiguës (myéloïdes ou lymphoblastiques) se caractérisent par une insuffisance médullaire responsable d'un déficit en cellules hématopoïétiques matures normales. Associé à l'expansion des cellules leucémiques, les patients présentent souvent une neutropénie, une thrombopénie et une anémie.



## IV. La Leucémie Aiguë Lymphoblastique T (LAL-T)

### IV.1 Généralités

Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont des maladies qui résultent de l'expansion clonale de progéniteurs lymphocytaires T bloqués à différents stades de leur différenciation. Deux pics de fréquence des LAL-T s'observent en fonction de l'âge. Le premier correspond aux enfants et jeunes adultes de moins de 18 ans et le second pic, aux adultes de plus de 50 ans. Chez l'enfant, la proportion des LAL-T représentent environ 10 à 15% des LAL contre 25% chez l'adulte (Hunger and Mullighan, 2015; Pui et al., 2004, 2015). Les LAL étant plus fréquentes chez l'enfant, parmi les LAL-T, 80% des cas sont pédiatriques et 20% touchent les adultes.

Au diagnostic, les patients présentent souvent des symptômes respiratoires et un élargissement à la fois du thymus et des ganglions lymphatiques. Les cellules leucémiques de LAL-T sont détectées dans de nombreux tissus tels que le sang, la MO, les ganglions lymphatiques, le thymus, la rate et le foie. L'infiltration souvent importante de la MO induit un défaut hématopoïétique qui se traduit par une neutropénie, une thrombopénie et une anémie. Comme dans le cas des autres leucémies aiguës, la LAL-T peut également s'accompagner d'un envahissement méningé avec atteinte du liquide céphalo-rachidien.

L'examen microscopique des cellules de la MO est essentiel et permet de poser le premier diagnostic de la présence des cellules leucémiques. La confirmation du diagnostic est apportée par l'analyse immunophénotypique et génétique dans les cellules leucémiques du sang et de la MO. Les différentes anomalies génomiques sont des éléments très importants dans la décision du traitement et permettent de déterminer l'intensité des chimiothérapies à employer.

### IV.2 Classification phénotypique des LAL-T

Les LAL-T sont définies par l'expression de surface ou intra-cytoplasmique de l'antigène CD3. Elles peuvent être classées selon le phénotype des lymphoblastes. Ces différentes classifications reposent, sur la base de l'expression de marqueurs de surface spécifiques de chaque étape de la différenciation lymphocytaire T (décrite dans le chapitre I.4.c). Parmi les classifications immunologiques qui ont été proposées, la classification de l'EGIL (pour European Group for the Immunological classification of Leukemias) est majoritairement utilisée. Elle définit quatre groupes de LAL-T, de la plus immature à la plus mature (**Tableau 1**) (Bene et al., 1995). Sur cette même base d'expression des marqueurs de surface, un cinquième sous-groupe de LAL-T a été décrit en 2009. Il s'agit des ETP (pour

Marqueurs Classification	cCD3, CD7	CD2, CD5	CD1a	CD4/CD8	sCD3
ETP	+	CD5 <sup>faible</sup>	-	-	-
Pro T (T-I)	+	-	-	-	-
Pré T (T-II)	+	+	-	-	-
Corticale (T-III)	+	+	+	Double Positive	-
Matures (T-IV)	+	+	-	CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup>	+

**Tableau 1 : Classification EGIL des LAL-T intégrant le sous-groupe des ETP.** (adapté de Bene M. C. et al., 1995 ; Constan-Smith E. et al., 2009).

Early T-cell precursor) qui sont définies phénotypiquement par l'expression de CD3 cytoplasmique, de CD7 en surface et qui sont associées à l'expression d'au moins un des marqueurs myéloïdes ou des cellules souches suivants: CD13, CD11b, CD33, CD65, HLA-DR, CD117 et le CD34 (Coustan-Smith et al., 2009) (**Tableau 1**).

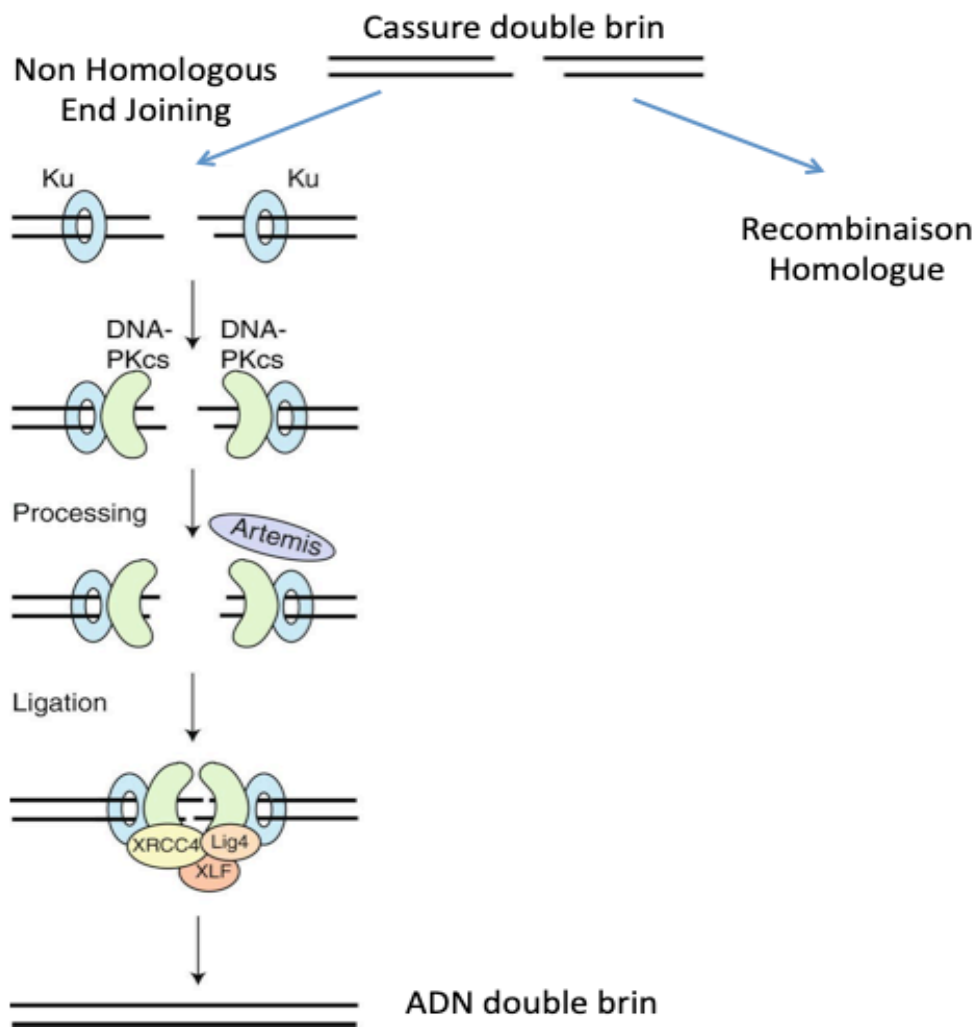
La classification immunologique EGIL est utilisée par défaut au moment du diagnostic. Elle est complétée par une classification basée sur les anomalies génétiques et moléculaires. Ces dernières seront décrites dans le **paragraphe IV.5.f**.

### IV.3 Modèles expérimentaux pour étudier les LAL-T

Au cours de ma thèse, j'ai principalement travaillé avec des cellules leucémiques de patients atteints de LAL-T, soit directement au diagnostic ou à la rechute (cellules primaires), soit ayant été propagées dans des souris immunodéficientes (on parle de xénogreffe). Ces échantillons provenaient à l'origine de prélèvements de sang ou de MO du patient. Des lignées cellulaires immortalisées issues elles-aussi de patients, la plupart pédiatrique, et des cellules leucémiques murines existent mais restent des modèles plus débattus de la biologie du patient. Quel que soit le modèle cellulaire utilisé, il peut être cultivé *in vitro* ou utilisé pour développer la pathologie *in vivo*.

#### IV.3.a Modèle d'étude *in vitro*

Contrairement aux lignées cellulaires immortalisées, les cellules leucémiques primaires de patients ne se maintiennent pas seules en culture liquide. Les cellules épithéliales thymiques (TECs) sont connues pour participer à la survie des cellules lymphocytaires T immatures. Partant de ces connaissances, le laboratoire de G. Rizzolo a montré que des TECs isolées à partir de thymus humains sont capables de soutenir *in vitro* la survie, via la production d'IL-7, d'échantillons cellulaires de LAL-T de patients adultes (Scupoli et al., 2003). Un autre modèle de co-culture a été proposé par S. S. Winter et ses collègues. Il s'agit de cellules stromales médullaires de MO humaines, les HS5 (pour Human Stroma 5) qui forment un tapis cellulaire sur lequel les cellules de LAL-T de patients prolifèrent (Winter et al., 2000). Mon laboratoire de thèse a également mis au point un modèle de co-culture de cellules primaires de LAL-T avec des cellules stromales de MO de souris, les MS5 (pour Mouse Stroma Cells 5). Le laboratoire a génétiquement modifié cette lignée stromale MS5 afin d'exprimer le DL1 humain à sa surface (MS5-DL1). Grâce à cet outil, le laboratoire a démontré que le soutien stromal ainsi que l'activation de NOTCH1 est nécessaire pour permettre la prolifération *in vitro* des LAL-T primaires (Armstrong et al., 2009). D'autres



**Figure 10 : Schéma de la réparation de cassure double brin de l'ADN par le système NHEJ (Non Homologous End Joining).** La protéine kinase DNA-PK intervient dans les premières étapes du processus NHEJ pour permettre entre autre le rapprochement des extrémités d'ADN.

modèles ont été occasionnellement développés tels que la co-culture avec des cellules dendritiques (Triplett et al., 2016) mais le modèle de co-culture avec des cellules MS5-DL1 fait référence dans le domaine de la culture des cellules d'échantillons primaires de LAL-T.

#### IV.3.b Modèle d'étude *in vivo*

Les études expérimentales menées sur ces cellules leucémiques sont de longue date effectuées *in vivo* grâce à la disponibilité de modèles de souris immunodéficientes. Le développement de ce type de souris a initialement permis de disposer d'un modèle unique d'étude de l'hématopoïèse humaine.

Pour mes travaux de thèse, j'ai utilisé la souche de souris NSG (pour NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ ) (The Jackson Laboratory) comme receveurs immunotolérants de cellules leucémiques des échantillons primaires de LAL-T pour générer des xéno greffes (ou PDX, pour Patient Derived Xenograft). Le fond génétique NOD (pour Non Obese Diabetic) qui héberge la mutation *scid* ainsi que la déficience en chaîne  $\gamma c$  des récepteurs aux cytokines IL2/7/9/15/21 cause une absence du complément circulant en raison d'une délétion de 2 bp dans la partie codante du gène de la protéine C5 du complément. D'un point de vue immunité cellulaire innée, les souris NOD sont défectueuses pour les populations de cellules dendritiques, de macrophages et cellules NK (Shultz et al., 1995). L'obtention du syndrome SCID (pour Severe Combined ImmunoDeficiency) (Shultz et al., 1995) a été obtenu après transfert de la mutation *scid* suite à des croisements avec des souris CB17 *scid/scid*. La mutation *scid* est une mutation du gène *Prkdc* qui code la sous-unité catalytique de la DNA-PK (pour Protein Kinase DNA-Activated catalytic polypeptide). Cette protéine kinase est impliquée dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par le système NHEJ (pour Non-Homologous End Joining) (**Figure 10**). Ce mécanisme de réparation intervient naturellement dans la recombinaison du TCR et des Immunoglobulines (Bosma and Carroll, 1991). Ainsi les souris NOD/SCID présentent, en plus d'une fonction réduite de leur immunité innée, un défaut majeur en lymphocytes T et B matures. Parce que les souris NOD/SCID présentent encore des fonctions immunitaires innées combinées à un échappement (« leakiness ») de l'immunité spécifique sous la forme de clones de cellules T ainsi que l'apparition de tumeurs thymiques fatales, un dysfonctionnement de la chaîne  $\gamma$  ( $\gamma c$ ) du récepteur aux IL 2/4/7/9/15/21, a été introduit soit sous la forme d'une mutation, soit sous la forme d'une délétion. Ce déficit de la chaîne  $\gamma$  de ces récepteurs prévient complètement le développement des cellules NK et des lymphocytes T normaux et anormaux (Shultz et al., 2005) et permet une immunodéficiency plus importante de ces souris.

Une grande proportion des LAL-T pédiatriques transplantées dans ces souris immunodéficientes est capable de reproduire une leucémie. La durée de développement de la leucémie est propre à chaque échantillon et est liée aux caractéristiques moléculaires et phénotypiques portées par les cellules (Lock et al., 2002; Poglio et al., 2015, 2016).

Grâce à ce modèle, S. Poglio et ses collègues ont pu classer les LAL-T selon leur rapidité de greffe en souris NSG. Les LAL-T dites « **rapides** » sont capables de se propager en moins de 82 jours. L'étude a montré que ces LAL-T sont plutôt des leucémies de type matures alors que les LAL-T dites « **longues** » sont quant à elles plutôt immatures (Poglio et al., 2015).

Des souris atteintes de LAL-T sont aussi utilisées comme modèles d'étude pathologiques *in vivo*. L'expression constitutive de protéines oncogéniques dans des progéniteurs hématopoïétiques ou dans les précurseurs thymiques, telles que ICN1 (pour domain Intra-Cellular Notch 1) (Aster et al., 2000), TLX-1 (pour T cell Leukemia homeobox protein 1) (De Keersmaecker et al., 2010) ou la délétion du gène codant la protéine IKAROS (Jeannet et al., 2010) dans les thymocytes de souris génèrent un développement leucémique T et sont utiles pour suivre les étapes précoces de l'oncogénèse T. Récemment un autre modèle murin de LAL-T a été généré par l'introduction de la protéine mutée DNMT3A<sup>R882P</sup> (pour DNA Methyl-Transférase 3A) à l'aide d'un lentivirus dans les cellules de MO d'un fond génétique *Tet2*<sup>-/-</sup> (Scourzic et al., 2016).

Selon la question posée, les différents modèles se complètent. Pour adresser la question de l'impact de l'expression d'oncogènes dans la différenciation lymphocytaire T normale différents modèles murins et humains ont été proposés (McCormack et al., 2010; Renou et al., 2017; Tremblay et al., 2010). En revanche pour adresser la question de la grande diversité des échantillons de LAL-T humains, les PDX restent le modèle le plus pertinent.

#### IV.4 Traitements des LAL-T

##### IV.4.a Généralités

Au cours des dernières années, les résultats des traitements par chimiothérapie se sont considérablement améliorés. La prise en charge thérapeutique des LAL-T se décompose en trois temps : la phase d'induction de la rémission, la phase de consolidation ciblant les cellules leucémiques résiduelles et la phase de maintenance à long terme. Grâce à une

utilisation intensive de la chimiothérapie, près de 80 % des jeunes patients peuvent actuellement être guéris (Goldberg et al., 2003; Pui and Evans, 2006).

**La phase d'induction** repose sur l'administration d'une poly-chimiothérapie utilisant plusieurs molécules telles que des glucocorticoïdes (prédnisone ou dexaméthasone) (Inaba and Pui, 2010), de la L-asparaginase (Amylon et al., 1999) des anthracyclines (daunorubicine ou doxorubicine), des vinca-alcaloïdes de la pervenche (vincristine), de la cytarabine et du cyclophosphamide (Pui and Evans, 2006; Pui et al., 2012). L'objectif de l'induction est l'obtention d'un hémogramme normal et de moins de 5% de cellules leucémiques au myélogramme. Au cours de la thérapie, l'évaluation de la maladie résiduelle minimale (« Minimal Residual Disease » ou MRD) permet de définir la réponse aux traitements : elle consiste à détecter la présence de cellules leucémiques résistantes par cytométrie en flux et par PCR quantitative. La MRD cellulaire est considérée comme positive lorsque la présence de cellules leucémiques, identifiées par un cocktail spécifique d'anticorps, dépasse 0,01% des cellules mononucléées dans la MO. La MRD moléculaire consiste à amplifier l'ADN des gènes des immunoglobulines et du TCR présents dans le clone au diagnostic à l'aide d'amorces spécifiques (Campana and Leung, 2013). La MRD moléculaire est considérée comme positive lorsque plus d'une cellule leucémique sont détectées sur 100 000 cellules mononucléées dans la MO.

**Le traitement de consolidation** comporte des chimiothérapies administrées sur plusieurs jours et de façon répétée, afin de prévenir la survenue d'une rechute. En fonction de l'efficacité du traitement d'induction, si la MRD est trop importante, sont alors envisagés d'autres stratégies thérapeutiques tel que la greffe autologue ou l'allogreffe de CSHs (Gökbuget et al., 2012).

**Le traitement d'entretien** concerne les patients pour lesquels une greffe n'est pas envisagée. Il s'agit d'une chimiothérapie associant entre autre la vincristine et la prednisone prise durant environ deux ans. Une évaluation de la réponse au traitement est effectuée par analyse de la MRD sur des prélèvements de la MO du patient.

#### IV.4.b Résistance et Rechute

L'optimisation des traitements a nettement amélioré les chances de survie des patients atteints de LAL-T et le taux de survie sans évènement à 5 ans après le diagnostic est

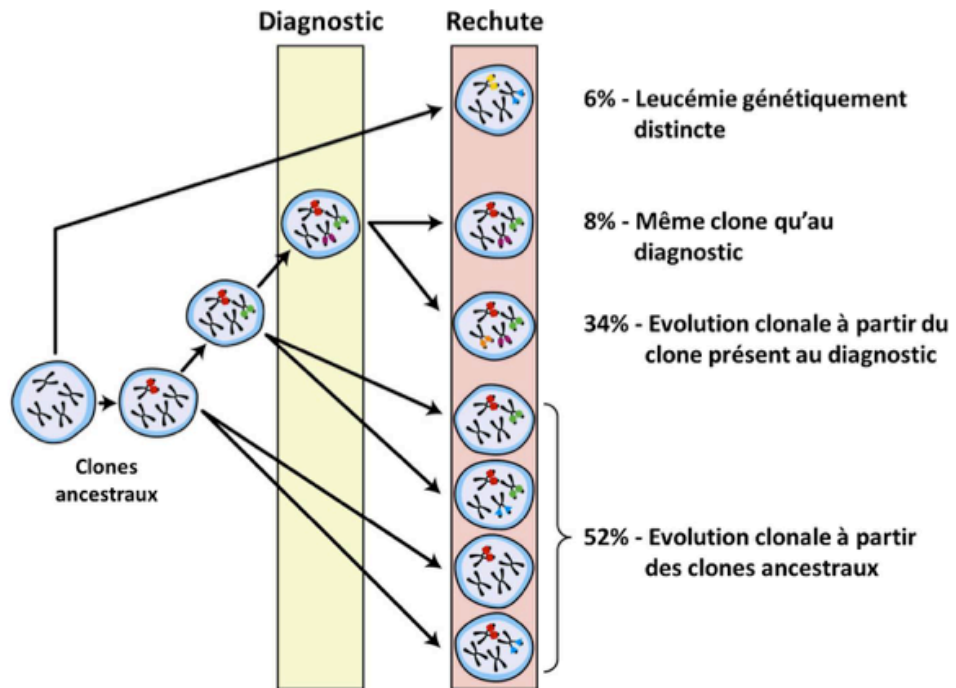


Figure 11 : Schéma des différentes possibilités de rechutes des LAL-T (adapté de Mullighan C. G. et al., 2008).



actuellement de 90% pour les enfants alors qu'il n'était que de 10% dans les années 1960 (Pui and Evans, 2013). La rémission complète durable n'est donc pas obtenue pour 10-20% des enfants et pour 50 % des adultes présentant une LAL-T (Belver and Ferrando, 2016). Chez ces patients, les rechutes sont de mauvais pronostic. D'autre part, la chimiothérapie et/ou l'irradiation entraînent des effets secondaires importants à long terme, tels que l'apparition de cancers secondaires (Pui et al., 2012). Étant donné que la chimiothérapie standard atteint des processus physiologiques généraux tels que la division cellulaire, une connaissance précise de l'architecture moléculaire des LAL-T pourrait révéler des voies de signalisation clés pour le traitement et ouvrir la voie à la conception de traitements innovants plus spécifiques.

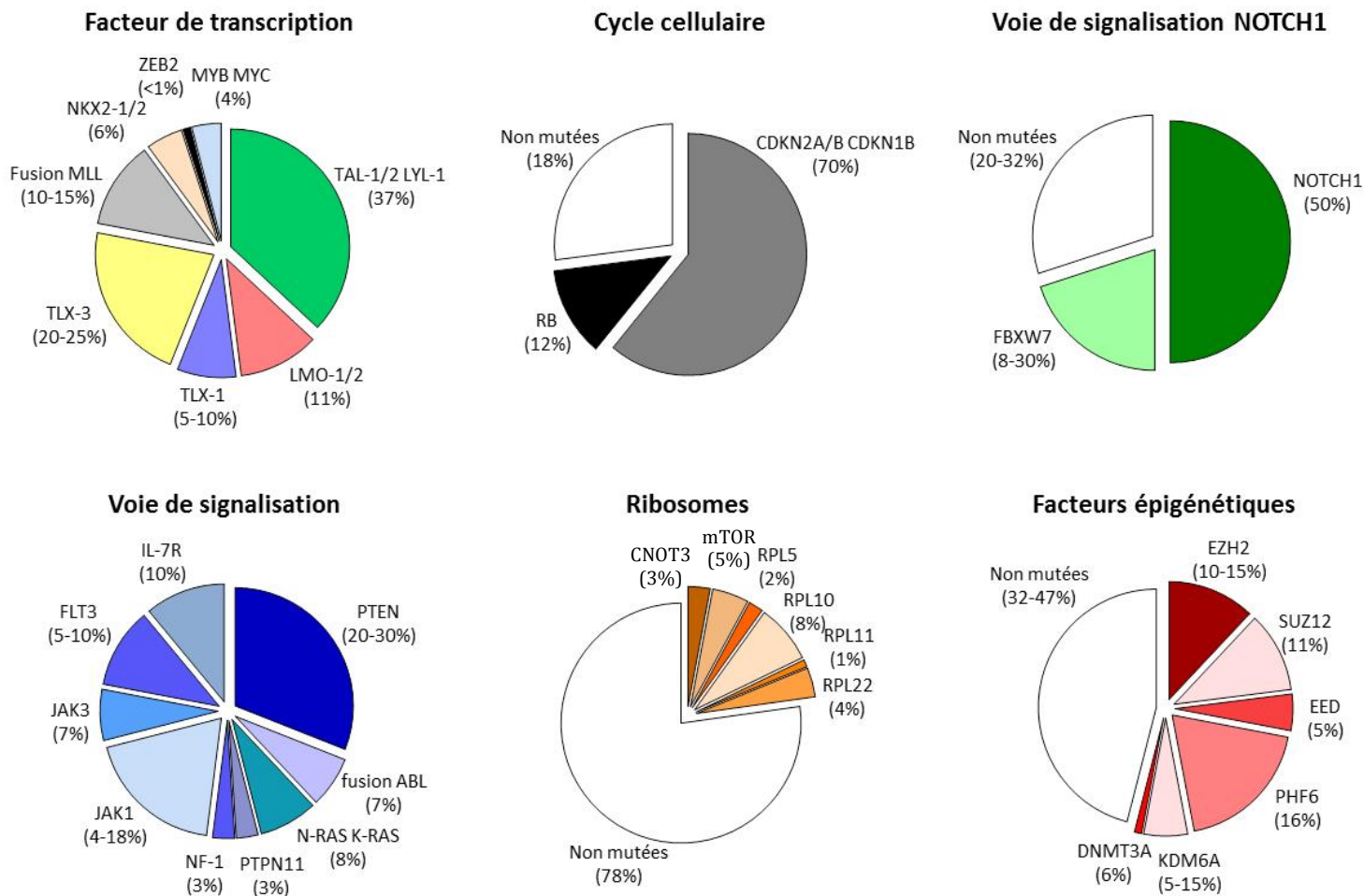
Plusieurs types de rechutes ont été identifiés en se basant sur les ressemblances génétiques entre le clone leucémique majoritaire du diagnostic et celui retrouvé au moment de la rechute. On distingue donc des rechutes impliquant un clone génétiquement distinct par rapport à la leucémie (dans 6% des cas), un clone génétiquement identique (dans 8% des cas), une évolution clonale avec accumulation de mutations à partir du clone présent au diagnostic (dans 34% des cas) ou un clone ancestral (dans 52% des cas) (**Figure 11**) (Mullighan et al., 2008).

De façon intéressante, une étude menée au laboratoire a montré une proximité génétique et d'expression transcriptionnelle entre les cellules leucémiques en expansion dans les xéno greffes de 5/8 patients testés et les cellules de la rechute du patient (Clappier et al., 2011). De façon intéressante, certaines des lésions génétiques détectées dans les cellules xéno greffées ont été détectées dans un clone très minoritaire au sein de l'échantillon au diagnostic et sélectionnées en souris (Clappier et al., 2011). Les cellules leucémiques issues de PDX se sont révélées plus résistantes à certaines drogues (Dexaméthasone et inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase) que les cellules du diagnostic mimant ainsi la résistance observées dans les rechutes (Clappier et al., 2011). L'utilisation du modèle de PDX est pertinente pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir les rechutes.

Globalement, la LAL-T est une maladie hétérogène en termes de phénotype, génotype, d'activité d'initiation de la leucémie et de résistance aux traitements.

#### IV.5 Altérations génétiques et épigénétiques des LAL-T

Les LAL-T résultent d'un processus multi-étape de transformation au cours duquel s'accumulent des altérations génétiques qui perturbent de manière coordonnée le contrôle



**Figure 12 : Fréquence des différentes altérations génétiques dans les LAL-T pédiatriques.**

Les altérations moléculaires de la LAL-T sont classés selon différents régulateurs cellulaires (facteurs de transcription, cycle cellulaire, voie de signalisation NOTCH1, voie de signalisation, ribosomes et facteurs épigénétiques). Ces groupes sont présentés sous forme de diagrammes où la fréquence de chaque anomalie génétique est représentée par une couleur. En blanc sont représentés la proportion des LAL-T non mutées pour cette fonction cellulaire. (adapté de Girardi T. et al., 2017, Belver L. & Ferrando A., 2016, Iacobucci I. & Mullighan C. G., 2017 ; Canté-Barrett K. et al., 2016 ; Balgobind B. V. et al., 2008 ; De Keersmaecker K. et al., 2013).

normal de la croissance, la prolifération, la survie et la différenciation lymphocytaire T (Belver and Ferrando, 2016).

Dans un premier temps, la cytogénétique a permis de mettre en évidence les translocations (impliquant en majorité les gènes du *TCR*) et les délétions (dont celles intervenant dans le locus 9p qui entraîne la perte d'expression de *CDKN2A/B*) retrouvées dans 90% des cas de LAL-T (Girardi et al., 2017). L'arrivée dans les années 2000, du séquençage du génome a permis d'identifier plus de 100 gènes qui peuvent être mutés dans les LAL-T (**Figure 12**). Ces données génomiques ont montré que les LAL-T cumulent environ 10 lésions génomiques (Girardi et al., 2017) (**Figure 12**).

#### IV.5.a La voie de signalisation NOTCH1 dans les LAL-T

Les altérations activatrices de la voie de signalisation NOTCH1 regroupe les événements oncogéniques prédominants impliqués dans la pathogenèse des LAL-T. A eux seuls, ils représentent plus de 60% des cas de LAL-T (**Figure 12**).

Concernant NOTCH1, sont répertoriés la translocation chromosomique t(7;9) (q34;q34.3), événement primaire très rare (moins de 1% des cas de LAL-T), qui génère la forme tronquée et constitutivement active de NOTCH1 (Belver and Ferrando, 2016) et les fréquentes mutations du gène *NOTCH1* (50% des cas de LAL-T en ont) qui confèrent un gain de fonction à la protéine (Weng et al., 2004) et qui sont secondaires à d'autres anomalies génomiques. Deux sites sont fréquemment mutés dans le gène *NOTCH1*. Le premier concerne le domaine d'hétérodimérisation (HD) responsable de l'association des sous-unités extracellulaire et transmembranaire de NOTCH1, il augmente l'efficacité de clivage par la  $\gamma$ -sécrétase. Le second correspond au domaine PEST (riche en Proline, Acide Glutamine, Serine et Thréonine) et permet d'augmenter la  $\frac{1}{2}$  vie de la protéine (Weng et al., 2004).

Des mutations sont aussi retrouvées dans le gène *FBXW7* (pour F-Box/WD repeat domain protein 7) qui lui confèrent une perte de fonction protéique (O'Neil et al., 2007). *FBXW7* est une sous-unité d'un complexe protéique impliqué dans l'ubiquitinylation de protéines et donc leur dégradation par le complexe du protéasome. Différentes protéines de la voie de signalisation NOTCH1 sont ubiquitinylées par le complexe protéique composé de *FBXW7*. Les mutations de *FBXW7*, événements secondaires dans 8 à 30% des LAL-T, apportent donc un gain de fonction à la voie NOTCH1 (Girardi et al., 2017).

#### IV.5.b Protéines régulatrices de la progression du cycle cellulaire

La perte de contrôle de la progression du cycle cellulaire est une caractéristique importante des cellules cancéreuses. Dans les LAL-T sont retrouvées des lésions géniques tel que les délétions du locus 9q dans lequel se trouvent les gènes codant CDKN2A (P16<sup>INK4A</sup> et P14<sup>ARF</sup>) et CDKN2B (P15<sup>INK4B</sup>) (pour Cyclin-Dependant Kinase inhibitor 2A et 2B). La délétion d'au moins un des gènes codant ces protéines est retrouvée dans plus de 70% des cas de LAL-T (Belver and Ferrando, 2016). La protéine P16 inhibe la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S en inactivant directement le complexe CDK4-Cycline D et CDK6-Cycline D. La protéine P14 facilite l'arrêt de la progression du cycle cellulaire et induit l'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN via l'inhibition de MDM2 (pour Mouse Double Minute 2), un régulateur négatif de P53. 12% des cas de LAL-T présentent également une délétion du gène *RBI* (pour Retinoblastoma 1), régulateur clé de la progression du cycle cellulaire. D'autres processus d'inactivation, tel que l'hyperméthylation des promoteurs, ont été rapportés pour l'inactivation de CDKN2A ou CDKN1A portant à plus de 90% les lésions responsables d'altérations de la progression du cycle cellulaire (Girardi et al., 2017). Ces lésions ne sont pas mutuellement exclusives, elles peuvent apparaître dans la même cellule leucémique (Figure 12).

#### IV.5.c Protéines kinases des différentes voies de signalisation

L'interleukine IL-7 est essentielle pour le développement normal des thymocytes (abordé plus tard dans le **paragraphe IV.7.a**). L'interaction IL-7/IL-7R induit la phosphorylation de JAK1 et JAK3 (pour Janus Kinase 1 et 3) ce qui permet le recrutement ainsi que l'activation de STAT5 (pour Signal Transducer and Activator of Transcription factor 5). Des variations du nombre de copies des gènes ou des mutations entraînant un gain de fonction de ces différentes protéines sont retrouvées dans plus de 27% des cas de LAL-T (Vicente et al., 2015; Zenatti et al., 2011). Récemment, il a été montré que des mutations entraînant une perte de fonction de la Dynamine 2 augmentent l'exposition de l'IL-7R à la surface de la cellule en altérant son endocytose permise par la Clathrine (Girardi et al., 2017). La sensibilité des cellules leucémiques à l'IL-7 en est par conséquent exacerbée. Ces différentes altérations de la voie de signalisation de l'IL-7 montrent à quel point cette voie est essentielle à la LAL-T.

La voie de signalisation PI3K-AKT est également activée dans les cellules leucémiques et cela par la perte (mutations ou délétions) de la phosphatase PTEN (pour Phosphatase and Tensin homolog) essentielle à la régulation négative de cette signalisation

(Canté-Barrett et al., 2016). L'altération protéique de PTEN est retrouvée dans 10-20% des cas de LAL-T adultes ou pédiatriques respectivement (**Figure 12**).

Enfin la voie de transduction du signal RAS-MAPK est elle aussi activée à travers des mutations de proto-oncogènes tels que HRAS, KRAS (pour Harvey et Kirsten rat sarcoma virus oncogene) et PTPN11 (pour Protein Tyrosine Phosphatase Non receptor type 11) (Belver and Ferrando, 2016; Girardi et al., 2017). La protéine NF1 (pour Neurofibromatosis 1) est un régulateur négatif de la voie de transduction du signal au niveau de RAS. Elle permet la transformation de la protéine RAS associée à une GTP (sa forme active) en RAS associée à une GDP (sa forme inactive). Des mutations ou délétions du gène *NF1* sont retrouvées dans 3% des LAL-T (Balgobind et al., 2008). Les mutations dans la voie de signalisation RAS sont souvent sélectionnées ou acquises durant le traitement et prédominent dans le clone leucémique de la rechute. Elles sont dans ce cas un facteur de mauvais pronostic (**Figure 12**).

L'étude de K. Canté-Barrett et ses collègues recensent la présence d'au moins 1 mutation entraînant une perte ou un gain de fonction dans des protéines impliquées dans l'une de ces 3 voies de signalisation dans 146 cas de LAL-T pédiatriques étudiés. Cela souligne l'importance de l'activation de ces cascades dans la progression de la LAL-T (Canté-Barrett et al., 2016).

#### IV.5.d Facteurs épigénétiques

Les récentes études de séquençage du génome ont permis de révéler l'implication de différentes protéines régulatrices des marques épigénétiques. Une liste non exhaustive des altérations des facteurs épigénétiques est présentée de la plus fréquente à la moins fréquente.

La protéine PHF6 (pour Plant Homeodomain Finger protein 6) fait partie des protéines qui « lisent » les marques de tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3). Cette marque de l'histone H3 est globalement associée à l'euchromatine. L'euchromatine est définie par la décondensation (totale ou partielle) de la chromatine. La protéine PHF6 est retrouvée absente (délétion, hyperméthylation de son promoteur) ou inactivée (mutation du gène) dans respectivement 16% et 38% des LAL-T pédiatriques et adultes. PHF6 s'associe à de nombreux partenaires pour réguler à la fois la transcription, la traduction et la réparation des cassures de l'ADN. Le rôle précis de l'inactivation de PHF6 reste à définir dans la LAL-T (Van der Meulen et al., 2014).

Les protéines EZH1/2, SUZ12, EED et RBBP4/7 qui composent le core du complexe PRC2 (pour Polycomb Repressor Complexe 2) interagissent avec des HDACs (pour Histones

Deacetylases) et des DNMTs (pour DNA Metyl-Transférases) permettant de di-ou tri-métyler la lysine 27 de l'histone H3 ce qui réprime la transcription. Dans plus de 25% des LAL-T la fonction de PRC2 est altérée par des mutations ou des délétions des gènes codant les protéines du core. Cela engendre l'absence de marques répressives de la transcription sur des gènes clés tel que les gènes cibles de NOTCH1 (Ntziachristos et al., 2012). De façon intéressante, l'activation de la voie NOTCH1 inhibe l'activité de PRC2 sur ses gènes cibles et le recrutement de la lysine déméthylase 6B (KDM6B) ce qui participe à la perte des marques répressives des gènes cibles de NOTCH1 (Ntziachristos et al., 2012).

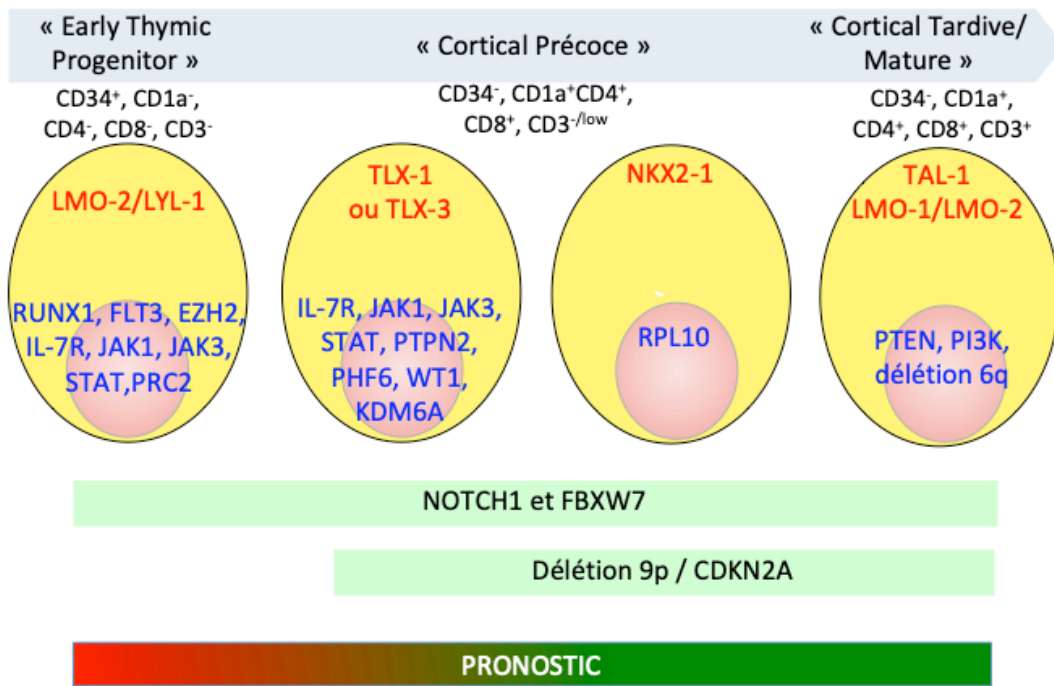
Des mutations dans le gène *KDM6A* codant l'histone déméthylase 6A sont aussi retrouvées à hauteur de 6% des cas de LAL-T (De Keersmaecker et al., 2013) (**Figure 12**). Contrairement à KDM6B, l'inactivation de KDM6A accélère la leucémogénèse dans le modèle ICN1 (Ntziachristos et al., 2014). De façon intéressante, cette protéine s'associe avec l'oncogène TAL-1, un facteur de transcription majeur de la LAL-T, afin d'enlever les marques répressives des gènes cibles de TAL-1. A. Benyoucef et ses collègues ont montré que l'inhibition de KDM6A dans les LAL-T exprimant l'oncogène TAL-1 permet d'altérer drastiquement la croissance leucémique *in vivo* (Benyoucef et al., 2016). Selon le contexte, KDM6A peut être un suppresseur de tumeur (pour la signalisation NOTCH1) ou un proto-oncogène (associé à TAL-1).

#### IV.5.e Régulation de la traduction

La synthèse protéique est généralement augmentée et requise pour les transformations malignes. Dans environ 20% des LAL-T, il a été répertorié des mutations des gènes codant les protéines ribosomales RPL5, RPL10 et RPL22 (pour Ribosomal Protein L 5, 10 et 22) (**Figure 12**) (De Keersmaecker et al., 2013). La mutation R98S de RPL10 entraîne l'augmentation de la synthèse des protéines impliquées dans la voie de signalisation JAK-STAT résultant en une hyper-activation de la voie en réponse aux stimulations cytokiniques. D'ailleurs, les mutations de RPL10 et des protéines impliquées dans la voie de signalisation JAK-STAT sont mutuellement exclusives (Girardi et al., 2018).

#### IV.5.f Facteurs de transcription (**Figure 12-Figure 13**)

Différents facteurs de transcription sont exprimés de façon aberrante dans les LAL-T. Différents mécanismes tels que des translocations, délétions intra-chromosomiques, inversion génique et insertion de séquence régulatrice sont décrits.



**Figure 13 : Classification et pronostic des LAL-T en fonction de leur phénotype de surface et de leurs altérations génétiques** (adapté de Girardi T. et al., 2017, Belver L. & Ferrando A., 2016, Gachet S. et al., 2019 ; Bongiovanni D. et al., 2017).



Approximativement, 50% des patients arborent des translocations chromosomiques qui impliquent le plus souvent une erreur de recombinaison V(D)J des gènes du TCR (Girardi et al., 2017; Iacobucci and Mullighan, 2017). Cette recombinaison juxtapose les gènes du TCR avec des gènes codant différents facteurs de transcription tel que :

- Les membres de la famille des bHLH (pour basic Helix-Loop-Helix) comme TAL-1, TAL-2 (pour T-cell Acute lymphoblastic Leukemia 1 et 2), LYL-1 (pour Lymphoblastic Leukemia associated hematopoietic regulator 1) et OLIG-2 (pour Oligodendrocyte transcription factor 2).
- Les protéines LMO-1 et LMO-2 (pour LIM domain Only 1 et 2).
- Les protéines à homéodomaine de la famille des HOX comme TLX1, TLX3 (pour T-cell leukemia homeobox 1 et 3), NKX2-1, NKX2-2 (pour NK2 homeobox 1 et 2) et HOXA (pour homeobox A).
- Les proto-oncogènes comme c-MYC (pour avian MyeloCytomatosis viral oncogene homolog) et c-MYB (pour avian MyeloBlastosis viral oncogene homolog).

L'expression ectopique de TAL-1, qui représente environ 30% des LAL-T, peut être aussi le résultat d'une micro-délétion cryptique de 90 kb. Cette délétion place le gène *TAL-1* directement après le premier exon du gène *SIL* (pour *SCL Interrupting Locus*) (Belver and Ferrando, 2016). Autrement, l'expression ectopique de TAL-1 est aussi permise par la présence d'une mutation dans une région inter-génique qui génère une région « super-enhancer » (8 kb en amont du site de démarrage de la transcription de *TAL-1*) sur laquelle vient se fixer le facteur de transcription MYB (Mansour et al., 2014; Navarro et al., 2015).

Contrairement à l'expression mutuellement exclusive des protéines TAL-1, LYL-1, TLX-1 et TLX-3, l'expression de LMO-1 et LMO-2 est associée à celle de TAL-1 et LYL-1 dans certaines LAL-T.

L'expression de ces différents gènes a permis d'élaborer une classification en sous-groupe moléculaire des LAL-T qui sont caractérisés par l'expression aberrante de facteurs de transcriptions oncogéniques spécifiques incluant TLX-1, TLX-3, NKX2-1, TAL-1, LMO-1 et LMO-2 (**Figure 13**) (Iacobucci and Mullighan, 2017). Le sous-groupe le plus représenté chez les patients est celui des « corticales tardives/matures » dans lequel l'oncogène TAL-1 est exprimé.

Les différents groupes définis par les oncogènes sont souvent associés à une signature phénotypique correspondant à l'étape de blocage de la différenciation (**Figure 13**). Les LAL-T dites « corticales tardives/matures », correspondant aux cellules leucémiques bloquées au



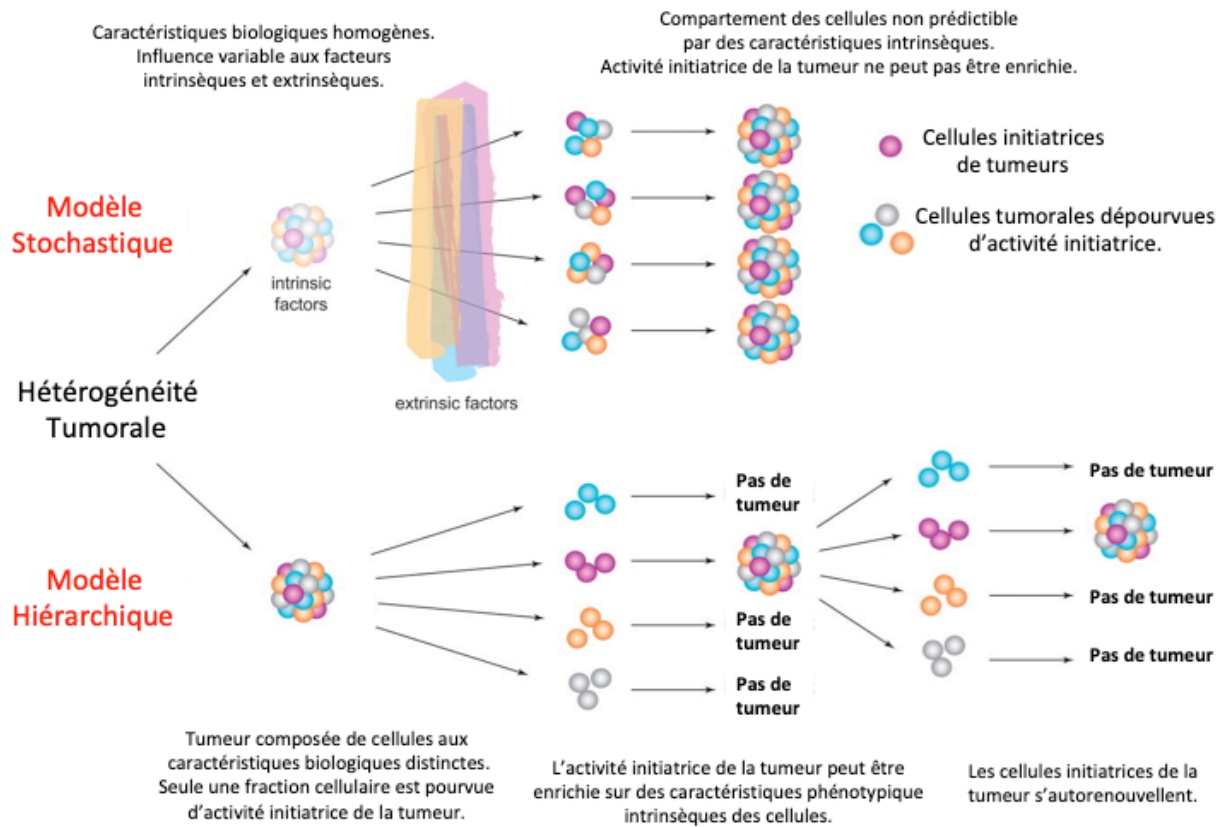


Figure 14 : Modèles théoriques de l'hétérogénéité tumorale (adapté de Dick J. E., 2008)

stade le plus engagé du développement T, sont de bon pronostic contrairement aux leucémies très immatures ETP (pour « Early Thymic Progenitor »).

Les LAL-T ne sont pas associées aux mêmes altérations si elles appartiennent à un sous-groupe ou à un autre (**Figure 13**). Par exemple, les délétions de *CDKN2A* sont souvent associées aux LAL-T corticales (TLX-1/2 ; TAL-1) mais très peu aux LAL-T « ETP » (LYL-1). Une récente étude a décrit l'ordre d'apparition des anomalies dans 4 cas de LAL-T de patients indiquant à titre d'exemple que la mutation d'oncogènes tels que *MED12* (pour Mediator of RNA Polymerase II transcription, subunit 12) ou *STAT5B* intervient précocement parmi divers événements pré-leucémiques, suivie par des événements intermédiaires comprenant l'inactivation de *CDKN2A/B*, l'acquisition de gènes de fusion, alors que les mutations *NOTCH1* sont généralement des événements tardifs (De Bie et al., 2018).

#### IV.6 Leucémogénèse des LAL-T

Il est admis que les cellules d'une même leucémie peuvent être assez hétérogènes en terme de morphologie, d'expression de marqueurs de surface, d'anomalies génétiques, de cinétique de prolifération et de réponse au traitement. L'hétérogénéité cellulaire et moléculaire représente un enjeu majeur dans la compréhension du développement de la leucémie mais aussi dans la mise en œuvre de traitements efficaces. Deux modèles sont proposés pour expliquer l'hétérogénéité cellulaire des leucémies: le modèle hiérarchique qui est inspiré de la hiérarchie standard de l'hématopoïèse et le modèle stochastique qui relève plus de mécanismes de sélection de clones adaptés ou pas à l'environnement tissulaire qui les héberge (**Figure 14**) (Kreso and Dick, 2014).

Au sein du modèle hiérarchique, différents concepts se confondent parfois autour du terme leucémogénèse. Je vais présenter dans ce chapitre les différentes populations cellulaires constituant une LAL-T et leur origine cellulaire.

Historiquement, le premier concept qui apparaît est celui des CILs (pour Cellule Initiatrice de Leucémie). Ces cellules présentent des caractéristiques « souches » telles que l'auto-renouvellement et la multipotentialité associées parfois à la quiescence. D'autres auteurs les nomment CSL (pour Cellule Souche Leucémique). Depuis peu, des études identifient la pré-CSL (pour Cellule Souche pré-Leucémique). Ces cellules présentent certaines fonctions des CSHs mais sont incapables en l'état de générer une LAL-T. Le dernier

concept qui émerge depuis peu est celui de la cellule originelle de la leucémie. Celle-ci se réfère aux cellules dans lesquelles la tumorigenèse a été initiée, i.e. les cellules normales de l'hématopoïèse où sont détectées les premières anomalies génomiques. Elle n'est pas forcément définissable comme une vraie CSH puisqu'elle n'est pas forcément capable de s'autorenouveler et d'être multipotente. Ces différents concepts seront détaillés dans les paragraphes suivants.

#### IV.6.a Les cellules initiatrices (CILs) ou souches (CSLs) de la LAL-T

Dès le début des années 1990, les études menées par le laboratoire du Dr John Dick sur les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) ont avancé le concept de la hiérarchisation de la leucémie. La xénotransplantation de cellules de LAM chez des souris immunodéficientes a considérablement contribué à la vérification formelle d'une organisation hiérarchique des leucémies. Ces études ont démontré que de rares cellules de LAM (d'une fréquence de  $1/10^4$  à  $1/10^7$  au sein des cellules mononucléées) étaient pourvues d'une capacité d'auto-renouvellement et de différenciation restreinte permettant de générer une LAM en transplantation en série. Ces cellules de type « souches » sont appelées cellules initiatrices de leucémie (CILs) dans les souris SCID et ont été décrites comme enrichies au sein de l'immunophénotype  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Les CILs ont été définies plus tard comme capables **1)** de générer une xéngreffe représentative de la tumeur mère, **2)** de s'auto-renouveler, comme le démontre le passage en série dans un test de xéngreffe à des doses de cellules clonales, et **3)** donner naissance à des cellules filles qui peuvent posséder une capacité de prolifération et sont incapables d'établir ou de maintenir le clone tumoral lors d'un passage en série (Clarke et al., 2006).

De la même façon que dans les LAM, toutes les cellules leucémiques d'un même échantillon de LAL-T ne sont pas également capables d'initier la leucémie avec la même efficacité après transplantation dans des souris immunodéficientes. L'étude menée par B. Gerby au laboratoire a montré par exemple qu'une population cellulaire  $\text{CD34}^+ \text{CD7}^+$  de LAL-T de patients au diagnostic est enrichie en CIL par rapport à la population  $\text{CD34}^- \text{CD7}^+$  de la même leucémie (Gerby et al., 2011). Contrairement à l'étude publiée par C.V. Cox en 2007, B. Gerby montre que des cellules  $\text{CD34}^+ \text{CD7}^-$  isolées du sang de patients sont capable de générer une hématopoïèse normale mais pas une LAL-T dans des souris immunodéficientes (Cox et al., 2007; Gerby et al., 2011). Un autre travail a montré que les CILs se retrouvent également enrichies dans la population  $\text{CD7}^+ \text{CD1a}^-$  (Chiu et al., 2010).

L'étude menée au laboratoire par S. Poglio a affiné ces données en montrant que les CILs des fractions CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup> et CD34<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup> des LAL-T dites « rapides » (Poglio et al., 2015) génèrent des leucémies génétiquement très similaires (Poglio et al., 2016). Dans ce cas, les CILs des deux fractions sont des sous-clones identiques dont la croissance est adaptée ou indépendante du microenvironnement des souris. La fréquence de ces CILs est moins importante dans les cellules CD34<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup> que dans les cellules CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup> (Gerby et al., 2011; Poglio et al., 2016). Les LAL-T qui se développent « lentement » dans les souris NSG (Poglio et al., 2015) sont elles aussi plus enrichies en CILs dans la fraction CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>. Mais les leucémies développées à partir des fractions cellulaires CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+/-</sup> présentent **1)** des lésions génétiques communes entre elles et avec l'échantillon du patient et **2)** des lésions génétiques supplémentaires distinctes. Ces résultats indiquent une évolution/sélection clonale durant le développement de la leucémie dans la souris (Poglio et al., 2016) qui est en accord avec l'étude de E. Clappier (Clappier et al., 2011).

De part leurs propriétés « souches », les CILs sont aussi définies comme responsables des rechutes (Chiu et al., 2010), élucider les mécanismes qui conditionnent l'auto-renouvellement et la quiescence est de ce fait primordial pour les éradiquer (Belmonte et al., 2016).

Chez la souris l'existence des CILs a été premièrement démontrée par l'utilisation de souris transgéniques qui déclarent une leucémie de type LAL-T permise par l'expression ectopique dans les cellules du lignage lymphoïde T de *Tal-1* (Kelliher et al., 1996) ou de *Lmo-2* (Larson et al., 1994). Ces deux modèles sont limitant puisque la pénétrance n'est pas totale et dans les cas où la LAL-T se déclare, celle-ci se développe après une longue latence d'environ 18 mois. En revanche, l'utilisation de souris transgéniques associant l'expression des oncogènes *Tal-1* et *Lmo-1* dans les thymocytes murins permet d'obtenir une pénétrance totale et diminue la latence d'apparition (3-6 mois) (Aplan et al., 1997; Tremblay et al., 2010). La leucémie générée est alors constituée de cellules DN et DP. Grâce à ce dernier modèle ou à celui permettant la co expression de *Tal-1* et *Lmo-2*, différents laboratoires ont montré que les CILs sont particulièrement enrichies dans la population DN3 et DN4 (Tatarek et al., 2011; Tremblay et al., 2010).

Chez la souris comme chez l'humain, le laboratoire de A. P. Weng a montré que les CILs sont fortement enrichis dans les cellules leucémiques exprimant peu de ROS (pour Reactive Oxygen Species) (Giambra et al., 2012). La protéine PKC- $\theta$  (pour Protein Kinase C- $\theta$ ), qui est impliquée dans la production des ROS dans les lymphocytes T normaux, régule

aussi le taux de ROS dans les LAL-T. L'augmentation d'expression de PKC- $\theta$  induit une production importante des ROS ce qui a un effet négatif sur l'activité des CILs (Giambra et al., 2012). A ce jour aucune étude n'a exploré le rôle négatif des ROS dans l'activité des CILs ni même vérifié si ces ROS sont plus faiblement présents dans les différentes populations enrichies en CILs. En revanche il est intéressant de noter que les cellules leucémiques exprimant peu de ROS dans le modèle de LAL-T ICN1 murins sont CD44<sup>+</sup> (Giambra et al., 2012). En effet, chez l'homme, le même laboratoire a montré que la protéine CD44 participe à la chimiorésistance des cellules leucémiques par l'efflux des drogues chimiothérapeutiques (Hoofd et al., 2016). Bien que ces modèles soient différents, si l'expression importante du CD44 est un trait phénotypique des CILs, il serait intéressant d'envisager une thérapie ciblée contre cette protéine qui permet un échappement au traitement.

Les modèles murins permettent une approche moléculaire et phénotypique de la CIL mais la relevance humaine reste à démontrer. En effet, contrairement aux modèles de leucémies murines, l'expression des marqueurs de surface des échantillons humains est plus diverse. Il est ainsi plus aisé d'associer les phénotypes des sous-populations de cellules constituant une LAL-T à la différenciation lymphocytaire T normale. Cela est peut être lié au fait que les leucémies murines sont souvent étudiées à partir du thymus des souris tandis que les leucémies humaines sont récoltées dans le sang et la MO, des environnements où elles échappent à la pression du développement T normal. D'autre part, la diversité clonale des LAL-T chez la souris est sans doute moindre que chez l'homme, peut être en lien avec la consanguinité des souris utilisées et/ou avec le temps nécessaire au développement leucémique (plus court chez la souris).

#### IV.6.b Les cellules pré-leucémiques (pré-CSLs)

Les études menées dans des modèles murins ont permis de rapporter l'existence de cellules souches pré-leucémiques (pré-CSL) dans les LAL-T. Les pré-CSLs partagent avec les CSH les propriétés **souches** (s'il s'agit de progéniteurs : ils ont acquis de nouvelles compétences fonctionnelles) mais sont incapables de générer, en l'état, la leucémie.

La population pré-CSL des LAL-T a été décrite pour la première fois dans les travaux du Dr Matthew M. McCormack en 2010. Dans le modèle de souris exprimant *Lmo2* sous le promoteur de *CD2* (dont l'expression est strictement restreinte aux thymocytes), M. M. McCormack et ses collègues ont montré que la population de cellules DN3 est pourvue de propriétés d'auto-renouvellement tout en conservant une capacité à générer des thymocytes différenciés (McCormack et al., 2010). Cette population active un programme d'expression

génique caractéristique des CSHs normales et réprime des gènes du développement des lymphocytes T (McCormack et al., 2010).

Parallèlement, le laboratoire de T. Hoang a montré que le modèle de souris transgéniques exprimant conjointement *Tal-1* et *Lmo-1* dans les thymocytes présente une amplification des différentes fractions des thymocytes DN (Tremblay et al., 2010). En l'état, leur injection en souris secondaires n'entraîne pas de développement leucémique. En revanche, la population DN3 exprimant *Tal-1* et *Lmo-1* acquiert la capacité à s'auto-renouveler. Celle-ci est enrichie au fur et à mesure des transplantations sériées tout en conservant son potentiel de différenciation dans les souris secondaires (Gerby et al., 2014). Cette population présente également une signature transcriptomique proche de celle des CSHs. Les auteurs identifient ainsi *Lyl-1* comme étant un acteur important **1)** de cette signature transcriptomique commune et **2)** de la capacité d'auto-renouvellement des thymocytes DN3 en association avec *Tal-1* et *Lmo-1* (Gerby et al., 2014). Les auteurs montrent aussi que la forte activation de la voie NOTCH1 conditionne la « programmation » des cellules DN3 en pré-CSLs. Dans ce modèle, B. Gerby et ses collaborateurs identifient les pré-CSLs comme étant des cellules DN3 thymiques.

L'auto-renouvellement des pré-CSLs correspond à un événement d'initiation de la LAL-T. Elle permettrait, selon les auteurs, une conservation de ces cellules sur un long terme, un avantage prolifératif par rapport aux mêmes cellules normales et l'accumulation de mutations géniques requises pour une transformation leucémique effective. Par conséquent, il est crucial de regarder si les pré-CSLs persistent suite à un traitement par chimiothérapie dans ces modèles. Dans ce cas, ces cellules participeraient alors aux rechutes et représenteraient un enjeu majeur pour le patient. En effet, si on repense à l'étude de C. Mullighan sur la génétique des cellules de LAL-B et -T en rechute par rapport au diagnostic, 52% des rechutes ont une origine commune avec les cellules du diagnostic expliqué par un clone ancestral présent entre ces deux moments des leucémies, soulignant l'existence de ce type cellulaire primitif dans la leucémie, non éradiqué par les traitements (Mullighan et al., 2008). Néanmoins les différents modèles murins présentent une expression ectopique des oncogènes strictement dans les thymocytes ce qui peut être une limite dans la détermination des modes de régulation du développement leucémique à partir de pré-CSL. En effet, une étude très récente montre que la pathologie humaine diffère quant à la cinétique d'apparition et la cible cellulaire des hits oncogéniques qui peuvent être détectés dans des cellules de la MO de phénotype immature CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> (De Bie et al., 2018). On peut donc s'interroger sur la réalité de la population DN3 décrite chez la souris dans les prélèvements de patients. Ces modèles murins apportent

un degré de compréhension moléculaire indéniable mais il faudrait pouvoir étudier les cellules du thymus des patients pour s'assurer de sa relevance. Il est aussi possible que selon le type (immature, cortical ou mature) de LAL-T, la population de pré-CSL change.

Il a été récemment montré qu'une surexpression transitoire et restreinte de *Lmo2* aux CSPHs engendre aussi une amplification des thymocytes DN pré-leucémique (García-Ramírez et al., 2018). Cette étude n'a pas caractérisé les pré-CSLs mais les auteurs montrent que l'expression aberrante de *Lmo-2* dans les CSPHs suffit à reprogrammer les thymocytes dans un statut pré-leucémique. La pénétrance leucémique est d'ailleurs totale et le délai d'apparition est identique à celui obtenu dans le modèle murin utilisé par M. M. McCormack (García-Ramírez et al., 2018). Ce modèle indique que dans le cas de LMO-2, la dérégulation de son expression en amont ou pendant le développement T a autant d'effet ce qui témoigne bien du fait que les pré-CSL peuvent être diverses, et pas forcément localisées dans les mêmes organes hématopoïétiques. L'éradication de ce type de cellules nécessitera encore des études approfondies étant donné les différences d'interaction possibles avec un microenvironnement spécifique.

#### IV.6.c Les cellules à l'origine de la LAL-T

Les concepts de pré-CSLs et de cellule à l'origine de la leucémie sont très proches. Toutefois, ils se distinguent par le fait que les cellules originelles sont des cellules hématopoïétiques porteuses de mutations ne révélant aucune anomalie fonctionnelle et les pré-CSLs seraient des cellules hématopoïétiques porteuses de mutations ayant acquis des propriétés de CSHs.

Des cellules originelles ont été décrites très récemment dans les LAL-T à la fois chez la souris et chez l'homme.

Dans un modèle murin de surexpression transitoire de la protéine *Lmo-2* dans les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (CSPHs), il a été montré qu'il serait possible de générer une LAL-T à partir des CSPH, exprimant le marqueur *Sca1*, sans nécessité de maintenir l'expression de l'oncogène, ici de *Lmo-2*, dans les thymocytes. L'expression de *Lmo2* est nécessaire pour initier un programme génique de transformation et les cellules cibles d'origine dans cette étude sont des CSPHs (exprimant *Sca-1*) mais LMO-2 n'est pas nécessaire pour la transformation en LAL-T « classique ». Les auteurs montrent que des mutations additionnelles interviennent dans le processus de transformation et que le thymus est essentiel pour obtenir le phénotype final de LAL-T « classique » (García-Ramírez et al., 2018). En l'absence de thymus, une leucémie de type ETP exprimant LMO-2 se

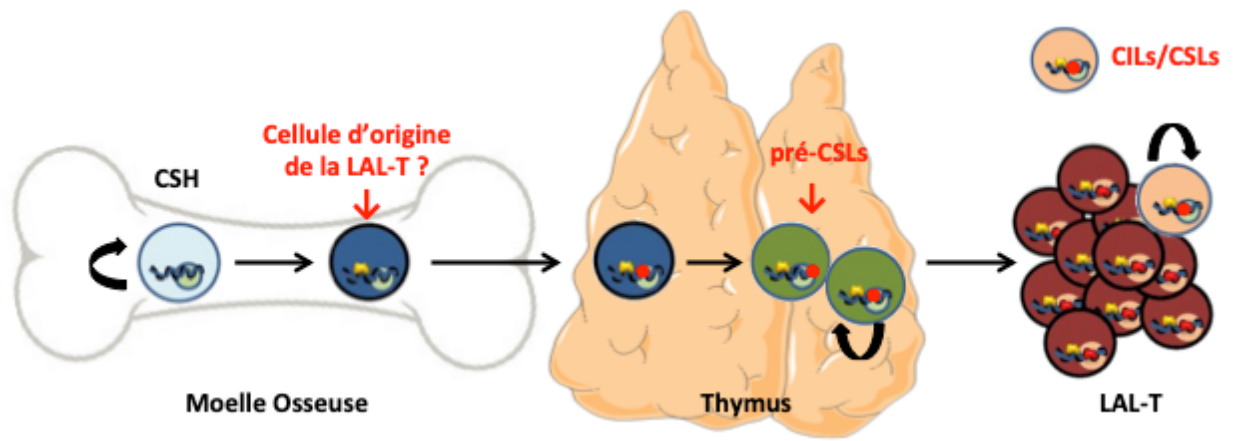


Figure 15 : Modèle de développement des LAL-T de la cellule originelle à la pathologie intégrant le concept des pré-CSLs et les CILs/CSLs. (adapté de Garcia Ramirez I. et al., 2018).



développe dans les organes hématopoïétiques secondaires. Dans ce modèle, les cellules ETP seraient des pré-CSL. Ce modèle est une preuve de concept que les cellules progénitrices hématopoïétiques normales peuvent présenter un premier événement oncogénique qui ne les transforme pas fonctionnellement mais qui va entraîner le développement d'une LAL-T ultérieurement dans un autre compartiment cellulaire (thymus ou rate).

L'existence de la cellule originelle de la LAL-T chez l'homme est indiquée dans une étude utilisant la technique de séquençage d'ARN à l'échelon de la cellule unique. L'équipe de J. Cools a déchiffré l'ordre d'apparition des mutations impliquées dans la leucémogénèse des LAL-T dans différentes populations de CSPHs humains normaux de la MO. L'étude montre que des CSPHs de phénotype  $CD34^+CD38^-$  isolées à partir de MO de certains patients peuvent présenter certaines des mutations identifiées dans la leucémie (De Bie et al., 2018).

Tout comme dans l'étude de I. Garcia Ramirez chez la souris, les premiers événements oncogéniques peuvent donc survenir dans un compartiment de progéniteurs hématopoïétiques normaux au sein de la MO. Cependant dans l'étude humaine comme dans l'étude du modèle murin de LAL-T LMO-2, rien n'est démontré quant à la normalité fonctionnelle des CSPHs étudiées, par exemple par des transplantations en souris receveuses.

Le dogme de la leucémogénèse des LAL-T consiste à penser que les premiers événements oncogéniques de la LAL-T interviennent dans le thymus. Ces derniers résultats apportent une preuve que la cellule originelle de la LAL-T peut être localisée dans la MO. Ces observations sont importantes dans le cadre de la transplantation de cellules souches chez les patients atteints de LAL-T à haut risque. La greffe de cellules souches autologues peut en effet conduire à une rechute, dans le cas où les cellules originelles de MO de la LAL-T ne seraient pas éradiquées. De même, si un frère ou une sœur jumelle est utilisée comme donneur de CSHs pour un jeune patient leucémique, il faudra être sûr que le compartiment des CSHs du donneur n'est pas contaminé par des cellules originelles ou pré-leucémiques, comme décrit dans les LAL-B de l'enfant (Hong et al., 2008).

L'ordre d'apparition de ces compartiments cellulaires est le suivant : les **cellules originelles de la leucémie** qui vont générer des cellules pré-leucémiques dans lesquelles se trouvent les **pré-CSLs**. Grâce à ces modèles, il a été montré que la LAL-T émerge après une période de latence durant laquelle vont survenir des mutations additionnelles. Au sein de la leucémie établie sont alors identifiés les **CILs** capables de générer la leucémie une fois transplantées dans le modèle expérimental murin (**Figure 15**). Ce schéma est une vision qui tend à évoluer et l'apport des nouvelles technologies sera un atout indéniable pour explorer

plus en détail cette hiérarchie leucémique.

#### IV.7 Rôle du microenvironnement dans le développement des LAL-T

Durant de longues années les efforts thérapeutiques se sont concentrés sur les facteurs intrinsèques impliqués dans le développement des LAL-T. Comme expliqué dans le **paragraphe IV.3.a** les facteurs intrinsèques ne sont pas suffisants à la croissance infinie des LAL-T *in vitro*. De même, certaines LAL-T ne se propagent pas *in vivo* en souris immunodéficientes, et d'autres se développent très lentement avec une sélection de rares clones semblant plus indépendants aux facteurs environnementaux (voir **paragraphe IV.3.b**). Bien que récente, la littérature expliquant le rôle du microenvironnement dans l'expansion des cellules leucémiques de LAL-T est grandissante. Je vais d'abord me concentrer sur les facteurs solubles (chimiokines, facteurs de croissance, cytokines) qui ont été décrits comme impliqués dans le devenir des cellules leucémiques de LAL-T puis je décrirai les interactions avec les cellules et la matrice extracellulaire du microenvironnement.

##### IV.7.a Facteurs solubles

Les chimiokines produites par la MO et le thymus participent respectivement au développement de l'hématopoïèse et à la différenciation lymphocytaire T. Certaines d'entre elles affectent tout particulièrement le développement des LAL-T.

**CXCL12/CXCR4** : Les cellules leucémiques de LAL-T expriment à leur surface une concentration protéique de CXCR4 très importante (Pitt et al., 2015). Les auteurs ont montré que les cellules leucémiques de LAL-T sont principalement localisées à proximité des cellules périvasculaires et vasculaires (Pitt et al., 2015). Bien que les cellules endothéliales vasculaires ne soient pas la première source de production de CXCL12 dans la MO (Baryawno et al., 2019; Ding and Morrison, 2013; Greenbaum et al., 2013; Tikhonova et al., 2019), L. A. Pitt et ses collaborateurs ont démontré que seule la production de CXCL12 par ces cellules endothéliales vasculaires est requise pour la maintenance et la progression des LAL-T *in vivo* (Pitt et al., 2015). Ce résultat n'est pas sans rappeler la maintenance des CSHs grâce au CXCL12 sécrété par les cellules endothéliales (Ding and Morrison, 2013). La délétion inductible de CXCR4 ou le traitement avec un antagoniste de CXCR4 (AMD 3465) diminue significativement l'expansion cellulaire des LAL-T. Les auteurs ont montré que l'activité des CILs est aussi altérée dans ce contexte (Pitt et al., 2015).

Par l'utilisation d'un modèle murin de délétion inductible de la Calcineurine, une

sérine-théronine phosphatase, le laboratoire de J. Ghysdael a démontré que la Calcineurine régule positivement la transcription de la Cortactine (Passaro et al., 2015). La Cortactine est une protéine impliquée dans la dynamique du cytosquelette en liant le réseau de filaments d'actine. Grâce à ce modèle, D. Passaro et ses collègues ont démontré que la présentation de la protéine CXCR4 à la surface des cellules leucémiques de LAL-T est dépendante de la Cortactine (Passaro et al., 2015). L'inhibition d'expression de CXCR4 à la surface des cellules leucémiques altère la capacité d'initiation de la leucémie en prévenant la capacité de migration des CILs dans la MO (Passaro et al., 2015).

Ces deux études publiées conjointement montrent à quel point les CILs de la LAL-T sont dépendantes de l'interaction CXCL12/CXCR4 pour migrer, se positionner dans la MO et propager la leucémie. Outre ces mécanismes, la signalisation induite par la fixation du ligand à son récepteur est aussi primordiale pour promouvoir l'expansion et permettre la survie des cellules leucémiques (Passaro et al., 2015; Pitt et al., 2015).

**CCL19-CCL21/CCR7** : l'interaction de la chimiokine CCL19 avec son récepteur CCR7 dicte le positionnement dans le thymus des précurseurs au cours de la différenciation lymphocytaire T. S. Buonamici et ses collègues ont montré que l'activation de la voie NOTCH1 est capable d'induire l'expression de CCR7 à la surface des cellules leucémiques de LAL-T (Buonamici et al., 2009). L'induction d'expression du gène *Ccr7* se traduit pas une surexpression protéique de CCR7 rendant les cellules leucémiques sensibles au pouvoir chimiotactique de ses deux ligands, le CCL19 et le CCL21 (Buonamici et al., 2009). Le CCL19 est sécrété par les cellules endothéliales des veinules du cerveau (Buonamici et al., 2009). En utilisant deux lignées cellulaires de LAL-T humaines, CEM et DND41, ainsi que des modèles murins, les auteurs ont démontré que l'interaction CCL19/CCR7 est essentielle et nécessaire à l'infiltration du système nerveux central (Buonamici et al., 2009).

L'infiltration du système nerveux central (SNC) par les cellules leucémiques chez les patients LAL-T représente 10% des cas (Marks et al., 2009). L'infiltration du SNC par les cellules leucémiques de LAL (T et B confondues) représente un facteur de mauvais pronostic pour la survie globale (Lazarus et al., 2006). Joindre une thérapie ciblée contre l'axe CCL19/CCR7 en combinaison d'une chimiothérapie conventionnelle pourrait peut-être permettre d'améliorer la survie globale.

**IL-18/IL-18R** : L'IL18 (pour Interleukine 18) est une cytokine pro-inflammatoire qui fait partie de la famille des IL-1 $\beta$ , importante pour les réponses immunes innées et adaptatives

(Garlanda et al., 2013). Selon la tumeur, l'IL-18 a été présentée comme ayant une action pro ou anti-tumorale.

Pour la LAL-T, le laboratoire a montré *in vitro* que l'IL-18 favorise l'expansion des cellules leucémiques de LAL-T de patients (Uzan et al., 2014). Tandis que l'utilisation d'un anticorps neutralisant de l'IL-18 murin réduit la prolifération leucémique dans le modèle de co-culture des cellules leucémiques de LAL-T de patients. De plus, interférer avec la voie de signalisation de l'IL-18 en diminuant l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-18 (IL-18R $\alpha$ ) permet d'altérer grandement le développement leucémique des échantillons xéno greffés dans les souris NSG (Uzan et al., 2014). D'autre part, les patients LAL-T présentent une concentration plasmatique plus importante d'IL-18 comparés à des sujets sains (Uzan et al., 2014). Ainsi, le développement leucémique semble entraîner une augmentation de la concentration d'IL-18 circulante qui profite à la leucémie en activant entre autre la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Uzan et al., 2014). Le laboratoire a d'ailleurs montré que l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B est importante pour supporter l'expansion des cellules leucémiques de LAL-T de patients pédiatriques en souris NSG (Poglio et al., 2015).

**IGF-1/IGF-1R** : L'IGF-1R (pour Insulin Growth Factor 1 Receptor) est le récepteur transmembranaire a activité tyrosine kinase de l'IGF-1 et IGF-2 (pour Insulin Growth Factor 1 et 2). La signalisation IGF-1/IGF-1R régule la croissance des cellules normales et contribue à la transformation et la progression de nombreux cancers et dont certaines hémopathies (Pollak, 2012). La liaison du ligand à son récepteur initie une cascade de phosphorylation activant ainsi la voie de signalisation PI3K-Akt et MEK-Erk pour induire respectivement la survie et la prolifération.

Les cellules de LAL-T de patient expriment fortement l'IGF-1R. H. Medyouf et ses collègues ont montré que l'ajout d'un inhibiteur pharmacologique de l'IGF-1R dans les cultures de PDX de LAL-T de patients compromet la prolifération des cellules leucémiques (Medyouf et al., 2011). De plus, la diminution d'expression de l'IGF-1R à la surface des cellules leucémiques altère l'activité à initier la leucémie en souris NSG. Les auteurs ont identifié un site de liaison fonctionnel de ICN1 dans un intron de la séquence codante IGF-1r. Celui-ci participe à l'augmentation de l'expression du IGF-1R en réponse à l'activation de la voie de signalisation NOTCH1 (Medyouf et al., 2011). Dans un modèle strictement murin, une étude récente a montré que les cellules dendritiques du microenvironnement tumoral étaient éduquées par les cellules leucémiques de LAL-T pour sécréter une quantité importante

d'IGF-1 et contribuer ainsi à l'expansion tumorale (Triplett et al., 2016).

**IL-7/IL-7R** : L'IL-7 est une cytokine produite par les cellules stromales de la MO, les cellules épithéliales du thymus et d'autres organes. Chez l'homme, elle est principalement connue pour son implication dans la différenciation lymphocytaire T normale. Chez la souris, elle participe aussi au développement des lymphocytes B. La liaison de l'IL-7 à la chaîne  $\alpha$  du récepteur (IL-7R $\alpha$ ) permet le recrutement de la chaîne  $\gamma$  ( $\gamma c$ ) du récepteur. S'en suit alors l'activation de la cascade de signalisation.

Il a été montré *in vitro* que l'IL-7 promeut la survie et la prolifération des LAL-T primaires de patients (Barata et al., 2001; Scupoli et al., 2003, 2007). Ce résultat a été confirmé *in vivo* puisque la xénogreffe d'échantillons humains de LAL-T dans des souris immunodéficientes n'exprimant pas l'IL-7 présente un délai d'expansion comparée aux mêmes souris immunodéficientes exprimant l'IL-7 (Silva et al., 2011). D'un point de vue moléculaire, l'IL-7 permet une expression importante de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (pour B-Cell Lymphoma 2) et maintient une expression faible de la protéine P27, qui est impliquée dans l'inhibition de la progression du cycle cellulaire, dans les cellules de LAL-T (Barata et al., 2004a; Melão et al., 2016; Silva et al., 2011). Il a été montré que la première source cellulaire de l'IL-7 dans la MO est la CSM (Nemoto et al., 2013). Comme pour l'IGF-1R, il a été montré que ICN1 est responsable de l'activation de l'expression transcriptionnelle de IL-7R $\alpha$  au cours de la différenciation lymphocytaire T et dans des lignées cellulaires de LAL-T humaines (González-García et al., 2009).

Il faut noter que plus de 70% des échantillons de LAL-T humains au diagnostic répondent à l'ajout d'IL-7 en culture et expriment l'IL-7R à leur surface (Barata et al., 2004b). Cette voie de signalisation est majeure pour le développement des LAL-T au point que 10% et 5% des échantillons pédiatriques et adultes respectivement présentent une mutation gain de fonction de l'IL-7R (Zenatti et al., 2011).

#### IV.7.b Interactions cellulaires ou interactions avec la matrice extracellulaire

Dans ce paragraphe je résumerai les données montrant l'implication des interactions entre les cellules des LAL-T, celles de différents microenvironnements et la matrice extracellulaire qui sont impliqués dans le développement et la croissance des LAL-T.

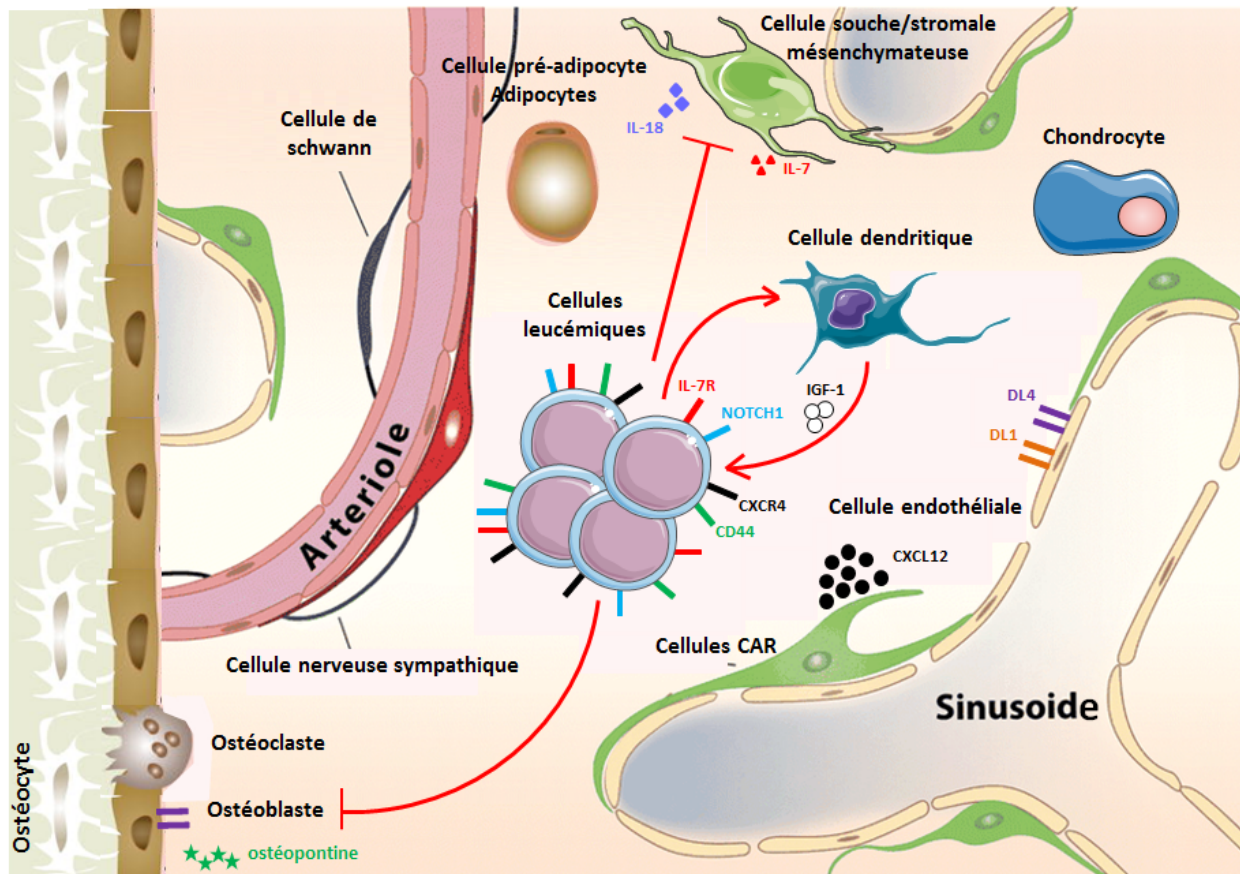
**DL1-DL4/NOTCH1** : Malgré des mutations gain de fonction de la voie de signalisation

NOTCH1 retrouvées dans une majorité des LAL-T, les cellules primaires de LAL-T peuvent rester sensibles à l'activation de NOTCH1 et nécessiter le contact avec un des ligands (Armstrong et al., 2009). La co-culture des cellules primaires de LAL-T sur MS5-DL1 (présentée au **paragraphe IV.3.a**) augmente leur expansion quel que soit le statut mutationnel de la voie de signalisation NOTCH1. De plus l'activité des CILs est maintenue en co-culture seulement lorsque le stroma MS5 présente le DL1 à sa surface (Armstrong et al., 2009). Le ligand DL4 qui est exprimé dans la MO par les cellules ostéoblastiques (Yu et al., 2015) et les cellules endothéliales des capillaires sinusoidales et arteriolaires (Baryawno et al., 2019; Tikhonova et al., 2019) induit aussi l'expansion leucémique de LAL-T primaires *in vitro* et *in vivo* (Minuzzo et al., 2015). Sa neutralisation *in vivo* par l'injection d'un anticorps bloquant réduit l'expansion des cellules leucémiques (Minuzzo et al., 2015). Cette dépendance à la signalisation NOTCH1 des cellules primaires de LAL-T interroge sur la pertinence de l'utilisation des lignées cellulaires de LAL-T qui ne nécessitent pas d'interaction ligand/NOTCH1 pour proliférer.

**Ligands/Intégrines** : Les cellules leucémiques expriment différentes intégrines telles que VLA-4, VLA-2 (pour Very Late Antigen 4 et 2) et LFA-1 (pour Lymphocyte function-Associated Antigen 1) (Winter et al., 2001). La survie des cellules de LAL-T en contact avec des cellules stromales de MO implique l'interaction LFA-1 et VLA-4 avec leurs ligands respectifs ICAM-1 et VCAM-1 (Winter et al., 2001).

**Ostéopontine, Acide Hyaluronique et CD44** : L'ostéopontine et l'acide hyaluronique sont des constituants de la matrice extracellulaire. L'ostéopontine est principalement sécrétée par les ostéoblastes dans la MO (Sodek et al., 1995). Concernant le récepteur de l'ostéopontine et de l'acide hyaluronique, appelé CD44, il a été démontré que les cellules leucémiques l'expriment toutes sans distinction de groupe oncogénique (Marques et al., 2018). Dans une étude publiée en 2018, M. Garcia Pedro et ses collègues ont montré que CD44 est une cible transcriptionnelle directe de NOTCH1 chez l'homme (García-Peydró et al., 2018). Le traitement *in vitro* des cellules leucémiques de LAL-T primaires par un anticorps bloquant du CD44 permet d'abroger complètement la capacité de xénogreffe en souris immunodéficientes. Ces données indiquent que les interactions du microenvironnement avec les cellules leucémiques via le CD44 sont essentielles à la greffe de la leucémie (García-Peydró et al., 2018). D'autre part, les auteurs ont également traité des souris immunodéficientes durant la phase d'expansion leucémique de LAL-T primaires. Ce traitement a permis de diminuer





**Figure 16 : Schéma représentant les différentes interactions entre les cellules leucémiques et les différents composants cellulaires de la MO.** Sont représentées également les différentes cytokines médullaires clés du développement de la LAL-T ainsi que l'éducation du microenvironnement par les cellules leucémiques. (adapté de Ding L. & Morrison S. J., 2013 ; Nemoto Y. et al., 2013 ; Triplett T. A. et al., 2016 ; Minuzzo S. et al., 2015 ; Sodek J. et al., 1995 ; Wang W. et al., 2016 ; Lim M. et al., 2016 ; Asada N. et al., 2017).

l'expansion leucémique et de réduire drastiquement la fréquence des CILs (García-Peydró et al., 2018). Ces données indiquent que CD44 est essentiel à l'activité des CILs et à la progression tumorale des LAL-T. Le mécanisme par lequel l'expansion des cellules leucémiques est altérée, et le mode d'action réel de CD44 dans la capacité à initier la leucémie ne sont à ce jour pas compris. Comme déjà dit dans le **paragraphe IV.6.a**, CD44 promeut l'efflux des drogues (Hoofd et al., 2016). Ces études confortent l'idée selon laquelle CD44 pourrait être le facteur clé qui définit les CILs tant du point de vue phénotypique que de la résistance aux drogues.

Malgré tout, l'importance de l'expression intense du CD44 à la surface des cellules leucémiques reste débattue. En effet, une récente étude a montré que l'intensité d'expression de CD44 à la surface des cellules leucémiques de LAL-T n'était pas 1) corrélée à l'expression d'un oncogène particulier ni même associée aux mutations activatrices de la voie de signalisation NOTCH1 et 2) un facteur de mauvais pronostic (Marques et al., 2018).

Par ailleurs, une étude récente a montré que les cellules leucémiques sont extrêmement motiles et ne présentent pas de préférence de localisation dans la MO (Hawkins et al., 2016). Malgré cela, les rôles établis du CXCR4 et du CD44 dans la capacité des cellules leucémiques à venir se loger dans la MO semblent contredire cette hypothèse. Ces différences majeures peuvent reposer sur le fait que ces études ont été menées dans des os différents de la souris. L'architecture osseuse, le microenvironnement moléculaire et cellulaire peuvent totalement différer entre ces sites et expliquer ainsi les variations d'observations. D'autre part, ces études sont principalement menées avec des lignées cellulaires de LAL-T murine, il n'est pas exclu que ces contradictions puissent s'accorder en considérant la grande diversité des LAL-T humaines. Toutefois, il est établi aujourd'hui que le microenvironnement participe de multiples façons à l'initiation ainsi qu'à la progression tumorale des LAL-T (**Figure 16**).

#### IV.7.c Résistance des LAL-T et Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM)

Les cellules leucémiques des LAL-T en se logeant dans la MO sont protégées en partie des effets des drogues. Les mécanismes impliqués restent à définir mais les CSMs semblent y participer par de multiples façons. Il a été par exemple montré que la co-culture des cellules de LAL-T avec des CSMs induit la fragmentation des mitochondries et par conséquent la diminution du taux des ROS mitochondriaux dans les cellules leucémiques. Cette diminution des ROS dans les cellules de LAL-T participe à leur protection contre deux agents chimiothérapeutiques, l'aracytidine et le méthotrexate (Cai et al., 2016).



Parallèlement, il est observé qu'*in vitro* les cellules de LAL-T traitées avec ces mêmes agents thérapeutiques transfèrent des mitochondries vers les CSMs. Ce transfert, dépendant des connexions intercellulaires nommées nanotubes tunnels, participe à la diminution du niveau de ROS dans les cellules leucémiques. Tout comme dans l'étude précédente, les auteurs ont montré que cette diminution du niveau de ROS abouti à la chimiorésistance des cellules leucémiques de LAL-T (Wang et al., 2018). Ces résultats corroborent le fait de caractériser les CILs selon la base de leur niveau de ROS comme démontré par V. Giambra et collègues (Giambra et al., 2012). Ainsi, si le niveau des ROS intracellulaires dans les cellules de LAL-T est réellement modulé par les CSMs, on peut dire que le microenvironnement de la MO participe à la définition et à la fonction de chimiorésistance des CILs.

#### IV.7.d Modification du microenvironnement par les LAL-T

Comme expliqué précédemment, le dialogue entre les cellules leucémiques de LAL-T et les cellules du microenvironnement a été démontré avec les cellules dendritiques pour la sécrétion d'IGF-1 (Triplett et al., 2016). D'autre part, différentes études ont montré que les ostéoblastes disparaissent à mesure que les cellules leucémiques infiltrent la MO (Hawkins et al., 2016; Wang et al., 2016). Chez la souris, ce mécanisme participe d'ailleurs à la perte fonctionnelle des CSPHs/LSKs (Wang et al., 2016). L'altération de la différenciation ostéoblastique serait causée par l'activation aberrante de la voie NOTCH1 dans les progéniteurs ostéoblastiques de la MO leucémique. L'utilisation d'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase restaure **1)** la quantité d'ostéoblastes de la MO et **2)** la fonctionnalité des LSKs (Wang et al., 2016). Ces résultats ont été confirmés avec des lignées cellulaires de LAL-T humaines xéno greffées dans les souris NSG (Wang et al., 2016). En plus des effets négatifs qu'exercent les cellules leucémiques sur les ostéoblastes, les CSMs deviennent sénescents lorsque que la MO est envahie par les cellules leucémiques. Cette entrée en sénescence altère de façon irréversible leur capacité de différenciation en adipocytes, en ostéocytes ainsi qu'en chondrocytes (Lim et al., 2016). Cet état de sénescence pourrait être lié à un transfert massif de mitochondries provenant de leucémie (Wang et al., 2018b). Malgré cela, les cellules LSKs préalablement co-cultivées avec des CSMs de souris ayant développé une LAL-T n'ont pas d'altération de leur capacité à régénérer de l'hématopoïèse après transplantation en souris « receveuse » (Lim et al., 2016).

L'ensemble de ces données montrent à quel point le dialogue entre les cellules de

LAL-T et celles composant le microenvironnement est bidirectionnel (**Figure 16**). Ce dialogue contribue au développement, à l'expansion et à la chimiorésistance des cellules leucémiques. Les interlocuteurs possibles des cellules leucémiques dans la MO sont nombreux. A ce jour, le rôle de chaque constituant cellulaire de la MO sur le devenir de la LAL-T reste encore à définir.

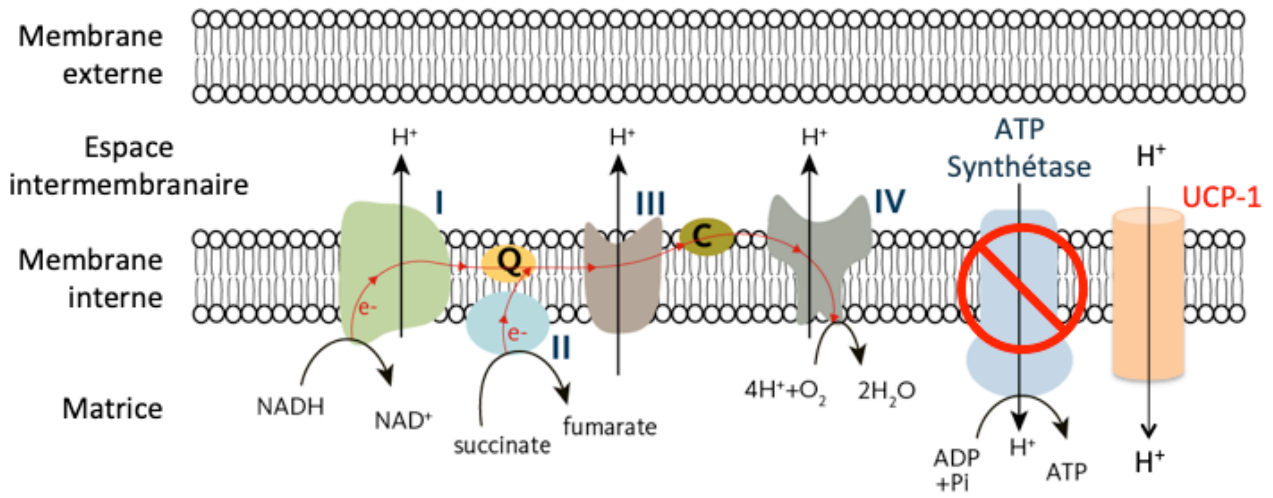


Figure 17 : Chaîne de la respiration mitochondriale des adipocytes du BAT avec la protéine découplante, UCP-1.

## VI. Le tissu adipeux

### VI.1 Définition et classification

Il existe deux grands types de tissu adipeux chez les mammifères. Le tissu adipeux blanc (WAT : White Adipose Tissue) qui maintient l'homéostasie énergétique et le tissu adipeux brun (BAT : Brown Adipose Tissue) qui assure la thermogénèse. Un troisième type de tissu adipeux est décrit, il s'agit des adipocytes beiges, localisés dans le WAT et qui ressemblent fonctionnellement au BAT. La masse de BAT est inversement corrélée à l'index de masse corporelle (BMI : Body Mass Index), alors que l'excès de WAT contribue à l'obésité. L'enjeu des adipocytes beiges est majeur puisque de nombreuses études cherchent à modifier le WAT en BAT via l'amplification de ces adipocytes particuliers pour combattre l'obésité (Bartelt and Heeren, 2014).

#### VI.1.a Le tissu adipeux blanc (WAT)

Le WAT est le tissu adipeux le plus volumineux dans le corps humain. Il est constitué d'adipocytes sphériques, présentant une gouttelette lipidique unique (uniloculaire) qui occupe la quasi-totalité du volume cellulaire. Le WAT est localisé en sous-cutané (sWAT) et également à travers des dépôts dans les viscères (vWAT). Le WAT stocke l'excès d'énergie sous forme de triglycérides dans la gouttelette lipidique. Lors d'une demande énergétique importante comme lors d'un effort musculaire, les triglycérides subissent une lipolyse dans les adipocytes. Cela génère du glycérol et des acides gras non estérifiés qui seront relargués puis utilisés comme substrat énergétique pour les cellules environnantes (Rosen and Spiegelman, 2014). Le sWAT joue aussi un rôle de protection contre les agressions mécaniques externes. Le vWAT se localise autour de certains organes vitaux pour assurer également un rôle de protecteur mécanique (Rosen and Spiegelman, 2014).

#### VI.1.b Le tissu adipeux brun (BAT)

Contrairement au WAT, le BAT est un tissu très vascularisé et innervé. Les adipocytes qui constituent le BAT sont de forme polygonale, accumulent de nombreuses gouttelettes lipidiques (multiloculaires) et une quantité importante de mitochondries. Dans les adipocytes du BAT, la membrane interne des mitochondries est perméable aux protons via la protéine UCP-1 (pour Uncoupling Protein 1). La dissipation du gradient de protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale contourne ainsi l'ATP Synthétase. Par ce mécanisme, il y a découplage de la phosphorylation oxydative (production d'ATP via la pompe ATP synthétase) de la chaîne de la respiration mitochondriale (**Figure 17**). L'énergie

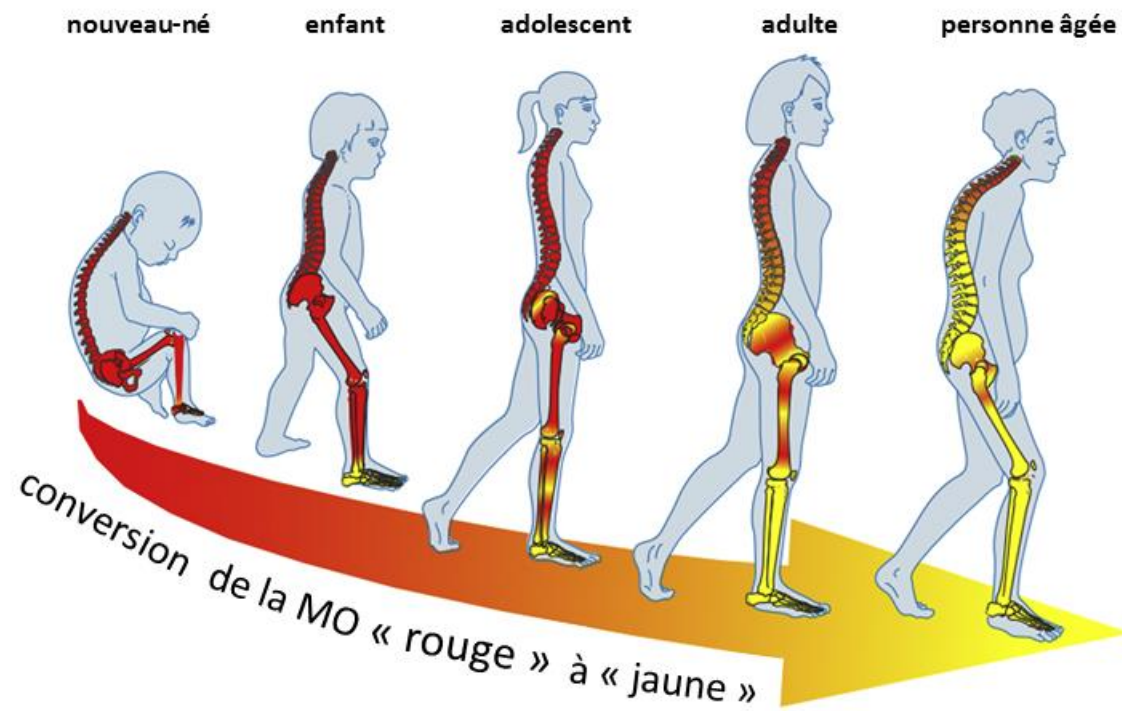


Figure 18 : Evolution du contenu en tissu adipeux de la MO au cours du vieillissement (adapté de Li Z. et al., 2018).

est alors libérée sous forme de chaleur. La protéine UCP-1 n'est exprimée que par les adipocytes composant le BAT et nullement par le WAT. L'importante vascularisation du BAT permet un apport conséquent d'oxygène hautement consommé par les mitochondries très actives des adipocytes bruns. En retour, la chaleur produite par le BAT est ainsi transmise au reste de l'organisme (Rosen and Spiegelman, 2014). Le BAT a longtemps été considéré comme involutif après la naissance. Aujourd'hui, il est décrit comme flexible et peut croître en réponse à des stimuli ou être atrophié en absence de ces signaux. Chez l'homme, le BAT est localisé au niveau des régions cervicale, supra-claviculaire, para-vertébrale, médiastinale et périnéale. Il est très présent et important pour la régulation de la chaleur des nouveau-nés et est grandement sollicité durant l'hibernation des animaux (Bargut et al., 2016; Rosen and Spiegelman, 2014).

Des premiers travaux ont montré que l'origine cellulaire des adipocytes du BAT et du WAT était strictement séparée. Contrairement aux adipocytes blancs, les adipocytes bruns partagent avec les cellules du muscle squelettique un précurseur commun qui exprime les facteurs de transcription Pax7 et Myf5 (Rosen and Spiegelman, 2014). Mais cette notion tend à évoluer puisque des travaux montrent que les adipocytes bruns, blancs et beiges peuvent partager un précurseur commun selon leur positionnement anatomique (Sanchez-Gurmaches and Guertin, 2014).

#### VI.1.c Le tissu adipeux médullaire (MAT)

La cavité médullaire se remplit de cellules hématopoïétiques pendant la vie fœtale, on parle alors de MO hématopoïétique ou « rouge ». Peu après la naissance débute le remplacement des cellules hématopoïétiques par des adipocytes. Ce processus se poursuit au cours du vieillissement. La MO devenue riche en adipocytes est nommée MO « jaune », et le tissu adipeux médullaire qui la compose, MAT (pour Marrow Adipose Tissue). La MO « jaune » commence à apparaître dans les os périphériques et s'étend progressivement de la périphérie vers le squelette axial (**Figure 18**). Le MAT est considéré chez l'adulte comme la troisième masse adipeuse la plus importante après le sWAT et le vWAT. Il a été montré, que l'infiltration de la MO par le MAT altère les fonctions et la différenciation des ostéoblastes. Cela se traduit concrètement par une baisse significative de la densité minérale osseuse (Fazeli et al., 2013) et par une atteinte du tissu hématopoïétique (que je décrirai en détails dans le **paragraphe VI.2.b**).

On distingue classiquement deux catégories de tissu adipeux de la MO, le MAT **constitutif** (MATc) et le MAT **régulé** (MATr). D'un point de vue morphologique, les adipocytes qui constituent le MATc, bien que plus petits ressemblent à ceux observés dans le WAT. Quant au MATr, ils sont morphologiquement plus petits que ceux qui composent le MATc. Chez le rongeur, le MATc est retrouvé dans la région distale du tibia et dans les vertèbres caudales (Li et al., 2018; Scheller et al., 2015). Chez le rongeur comme chez l'homme, le MATr est localisé dans la MO rouge de la région proximale du tibia, à la jonction avec le péroné, dans le fémur et dans le squelette axial. Le MATc se développe après la naissance. Le MATr apparaît après le MATc et s'étend en réponse à une myriade de facteurs incluant le vieillissement, la nutrition, des drogues pharmaceutiques (Li et al., 2018). De façon intéressante, l'induction de l'obésité chez la souris accroît la teneur en MATr sans pour autant impacter le contenu en MATc.

Expérimentalement, les caractéristiques du MAT restent controversées. En effet, l'induction de l'adipogénèse (MAT) dans la MO par un agoniste du PPAR $\gamma$  (pour Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ ) génère une augmentation transcriptionnelle à la fois des gènes clés impliqués dans la thermogénèse du BAT (UCP-1 et PGC1 $\alpha$ ) et des gènes signant le WAT (Adiponectine et Leptine) (Krings et al., 2012). Selon cette étude, le MAT serait donc un mélange de caractéristiques du BAT et du WAT. Mais cette étude n'a pas distingué le MATc du MATr et ce résultat pourrait être le fruit d'une hétérogénéité cellulaire du MAT étudié. L'imprécision a été corrigée en 2015 par un travail qui a permis de mettre en évidence des différences majeures entre ces deux dépôts de MAT. Bien que le MAT ait été précédemment associé à une signature transcriptomique de thermogénèse, le MATc ne s'expand pas et le MATr connaît une diminution de proportion suite à l'exposition au froid dans le tibia de souris (Scheller et al., 2015) ; caractéristique opposée au BAT et partagée par le WAT. Cette étude a aussi montré que les acides gras retrouvés dans les adipocytes qui composent le MATc sont plus riches en acides gras insaturés comparés aux adipocytes qui composent le MATr et le WAT (sous-cutané et viscéral). Ainsi, cette analyse rapproche le MATr du WAT et non du BAT sur sa composition en acides gras (Scheller et al., 2015).

Ces derniers travaux permettent de mieux distinguer les deux tissus adipeux qui composent la MO tant sur le contenu en acides gras que d'un point de vue morphologique. Mais les auteurs n'abordent pas le profil cytokinique des deux MAT. Cela semble tout aussi essentiel que la composition en acides gras si l'on souhaite connaître le rôle respectif de ces tissus adipeux sur le devenir des interactants cellulaires environnants.

Adipocytokines	Tissu adipeux
Adiponectine, Leptine, IL-6, Lipastine, IGF-1, Chemerine, RBP4, CXCL12	WAT, BAT et MAT
RANKL, SCF, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ -1, IL-8, IL-1 $\beta$	WAT, MAT
SCF, IL-3	MAT
Resistine, eNampt, Sfrp5, aP2, Ometine 1, Apeline, Vaspine, Nesfatine, Ostéopontine, Oncostatine M, LIF	WAT
Myostatine, FGF-2, FGF-21, Enthoteline-1, BMP8b, Follistatine, IGFBP-2, VEGF-A	BAT

**Tableau 2 : Adipocytokines sécrétées par les adipocytes des différents tissus adipeux** (adapté de Ouchi et al., 2013 ; Spyrou N. et al., 2018 ; Villaroya F. et al., 2017 ; Li Z. et al., 2018 ; Kim D. et al., 2014 ; Liu L. F. et al., 2011 ; Mattiucci D. et al., 2017).



#### VI.1.d Les facteurs sécrétés : les adipocytokines

La fonction sécrétrice est une caractéristique importante du tissu adipeux, notamment à travers la libération d'acides gras qui permet le maintien de l'homéostasie énergétique. Mais les adipocytes sont également hautement spécialisés dans la sécrétion de cytokines nommées **adipocytokines**. Plus d'une trentaine d'adipocytokines sont référencées à ce jour (**Tableau 2**). Elles régulent de nombreux processus physiologiques tels que : la sensibilité à l'insuline, l'inflammation, l'angiogenèse, la réponse immune et l'hématopoïèse (Spyrou et al., 2018). De façon intéressante, la comparaison entre les profils d'expression transcriptomique des adipocytes du vWAT (de l'épididyme) et du MAT montre que les transcrits de certains facteurs sécrétés (*Tnfa*, *Tgfb-1*, *Il-6*) sont fortement induits dans le MAT comparé au WAT. Ces données révèlent que le MAT, qui s'accroît au cours du vieillissement, présente un profil d'expression plus inflammatoire que celui du WAT de l'épididyme (Liu et al., 2011). Une étude menée *in vitro* avec du tissu humain montre que les adipocytes du MAT et les CSM (pour Cellules Souches Mésoenchymateuses) de la MO sécrètent un taux similaire de cytokines connues pour être impliquées dans la régulation et l'installation des CSH dans la niche hématopoïétique. Ce panel de cytokines (CXCL12, IL-8, LIF) est moins exprimé dans le surnageant de culture d'adipocytes du WAT. Les auteurs confirment aussi le profil plus inflammatoire du MAT comparé au WAT sur la base de la sécrétion plus importante de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 (Mattiucci et al., 2018).

Cette même étude serait intéressante à mener sur l'ensemble des sites adipeux tout en distinguant le MATr du MATc afin de véritablement statuer sur la ressemblance d'un point de vue sécrétrice d'un tissu adipeux à un autre. Au regard de la bibliographie grandissante sur ce sujet, on peut penser que selon la localisation, le WAT comme le BAT présenteront des sécrétomes différents et ce sera probablement aussi le cas du MATr et le MATc. Cette étude reste à faire maintenant que les caractérisations morphologiques et anatomiques sont largement définies chez la souris comme chez l'homme.

#### VI.1.e Le statut hypoxique du tissu adipeux

Il est admis que le WAT est un tissu assez peu vascularisé (Trayhurn, 2014). Des expériences menées chez la souris montrent que la mise en place d'un régime gras chez la souris augmente la teneur en WAT. Les auteurs de cette étude ont montré que ce WAT en expansion présente une augmentation significative de la transcription des gènes senseurs de l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  pour Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  et 2 $\alpha$ ) et du gène codant le

récepteur au glucose (Glut1 : un gène cible du facteur de transcription HIF-1 marqueur de l'hypoxie). De plus, la pression en oxygène (pO<sub>2</sub>) constatée dans le WAT est inversement corrélée à l'augmentation du poids de la souris. L'ensemble de ces données témoigne d'une mise en place de l'hypoxie lorsque ce tissu est en expansion (Rausch et al., 2008). De même chez l'homme, la pO<sub>2</sub> du sWAT de sujets non obèses est significativement supérieure à la pO<sub>2</sub> du même site de sujets obèses. Cette diminution de pO<sub>2</sub> serait probablement causée par la réduction de la densité de capillaires observée dans le tissu adipeux (Pasarica et al., 2009). Il est à noter également que la taille des adipocytes blancs (150-200 µm de diamètre) est au moins équivalente voire supérieure à la distance de diffusion de l'oxygène à travers les tissus (Trayhurn, 2014).

Toutes ces données convergent vers l'idée que le WAT est globalement un tissu hypoxique. Il est difficile d'imaginer que le BAT soit un tissu hypoxique étant donné sa forte vascularisation. En revanche, il a été observé récemment que le MATc est associé à une faible vascularisation (Zhou et al., 2017).

## VI.2 Les adipocytes et l'hématopoïèse

### VI.2.a Tissu adipeux blanc et régulation de l'hématopoïèse

D'une façon générale, les tissus adipeux sont composés d'adipocytes matures et d'une fraction vasculaire stromale (SVF pour Stroma-Vascular Fraction). Cellulairement, la fraction SVF représente plus de la moitié du WAT et est constituée de cellules stromales, de cellules endothéliales, de précurseurs d'adipocytes mais aussi de cellules hématopoïétiques matures et immatures (Poglio et al., 2010, 2012). Contrairement au WAT la mise en évidence de la fraction SVF dans le BAT est assez récente (Frazier et al., 2018). Chez la souris, la composition hématopoïétique du WAT et du BAT varie selon le site anatomique du tissu adipeux analysé mais aussi selon l'âge (Frazier et al., 2018). A ce jour, l'étude du tissu hématopoïétique dans le BAT débute seulement alors que de nombreux travaux ont étudié le devenir des cellules hématopoïétiques dans le WAT.

#### VI.2.a.i Les cellules immunitaires

Depuis les deux dernières décennies, le WAT n'est plus considéré comme un simple tissu de stockage énergétique, il est reconnu à ce jour comme un tissu actif de régulation du métabolisme et de l'immunité. En effet, le WAT est largement composé de cellules immunitaires matures, incluant les lymphocytes B et T, les macrophages et les mastocytes (Cousin et al., 2016). Les macrophages présentent deux statuts inflammatoires, les

macrophages M1 qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, et les macrophages M2 qui présentent un profil cytokinique anti-inflammatoire. L'obésité, et par conséquence l'augmentation du volume de WAT, entraîne *in situ* la disparition des lymphocytes T régulateurs et l'enrichissement des macrophages de profil M1 au détriment des M2 (Cousin et al., 2016). Outre cette modification de type cellulaire, la quantité de ces cellules s'accroît à mesure que le WAT s'amplifie avec l'obésité. Cet ensemble participe à la mise en place et à la maintenance de l'inflammation liée à l'obésité (Frasca and Blomberg, 2017; Poglio et al., 2010).

Quant au BAT, il se compose majoritairement de macrophages, d'éosinophiles et de lymphocytes B. L'augmentation du BAT lié à l'obésité dans un modèle murin s'accompagne d'une augmentation de la proportion de lymphocytes B et d'une diminution de la proportion de macrophages. Chez les souris obèses, les macrophages qui infiltrent le BAT semblent de nature moins inflammatoires que ceux qui infiltrent le WAT (Peterson et al., 2017).

Le métabolisme et l'inflammation sont directement connectés dans le WAT et cette association est primordiale dans les pathologies associées à l'obésité telles que les cancers solides et liquides. La sévérité des désordres métaboliques des patients obèses est directement liée à la quantité de cellules myéloïdes et lymphoïdes dans le WAT.

#### VI.2.a.ii Les progéniteurs et les cellules souches hématopoïétiques

Il est admis que les cellules matures qui infiltrent les tissus adipeux, proviennent majoritairement d'autres sites hématopoïétiques comme la MO via la circulation sanguine. Chez la souris, la greffe de cellules de MO CD45.1<sup>+</sup> « donneuses » dans des souris « receveuses » CD45.2<sup>+</sup> irradiées à dose létale, a permis de montrer qu'environ 15% des macrophages résidents dans le WAT ne proviennent pas du greffon mais de l'hôte (Cousin et al., 2016). Cette présence de cellules de l'hôte s'explique par une hématopoïèse locale. En effet, les LSKs, CLPs et CMPs sont retrouvés en nombre et en qualité suffisants pour expliquer l'hématopoïèse locale (Han et al., 2010). Cette hématopoïèse locale est efficace pour ré-initier l'hématopoïèse à long terme (4 mois après transplantation) dans une souris receveuse irradiée à dose létale. L'efficacité à ré-initier l'hématopoïèse est moindre comparée aux cellules de la MO (Han et al., 2010; Poglio et al., 2010, 2012). Après transplantation, la progénie des LSKs, dont l'origine tissulaire était le sWAT, est quasi indétectable dans la rate, le thymus ou le sang de la souris receveuse. A l'inverse, ces LSKs de sWAT sont plus efficaces que les LSKs issus de MO à s'établir dans le sWAT de la souris receveuse et à générer localement des mastocytes, des macrophages et des cellules NK (Poglio et al., 2012).

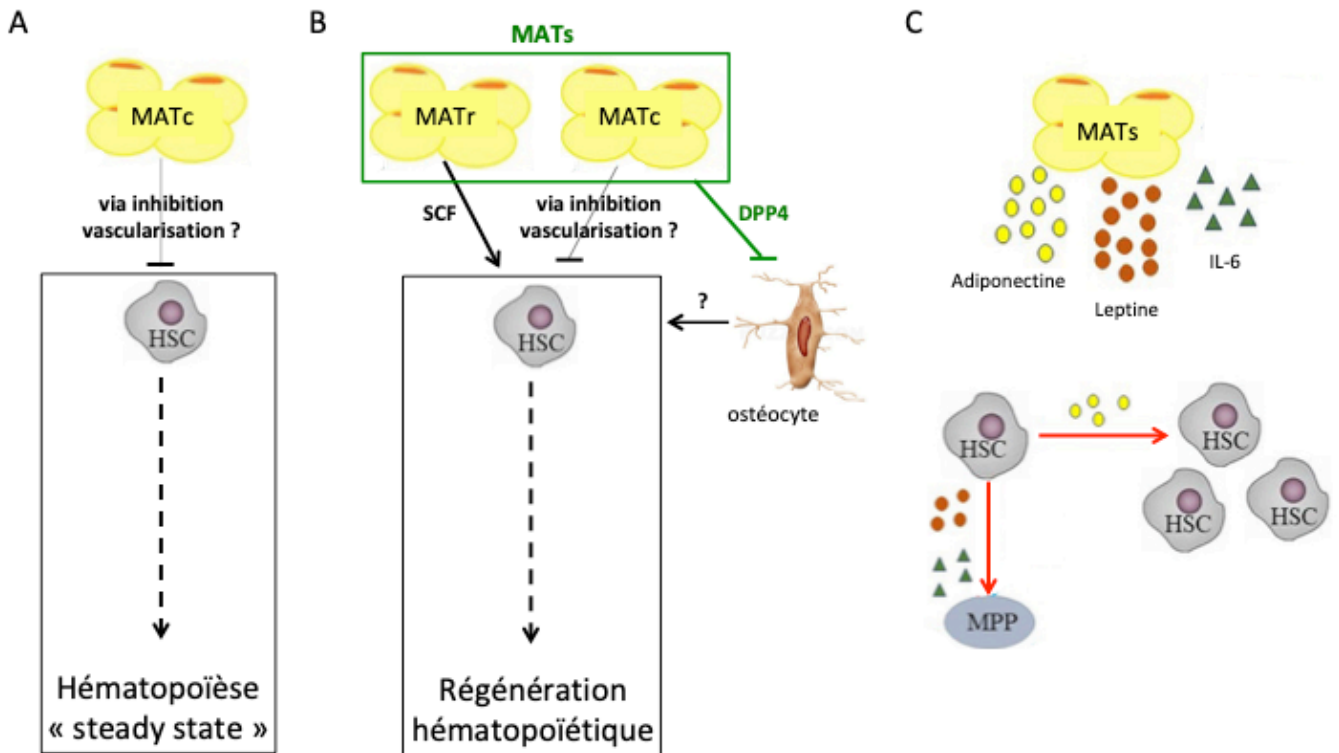
Des travaux en 2015 comparent la capacité des LSK du sWAT et du vWAT à régénérer de l'hématopoïèse. Les auteurs montrent que les LSK issues du sWAT et du vWAT sont retrouvées en nombre équivalent dans les deux tissus adipeux après transplantation chez la souris. Ils montrent aussi que le sWAT présente une meilleure activité hématopoïétique que le vWAT puisque le chimérisme CD45.1<sup>+</sup> (cellules issues des souris « donneuses ») dans les souris receveuses est toujours plus important (Luche et al., 2015).

Comme dit précédemment différents contingents cellulaires, dont des CSH, sont retrouvés dans les tissus WAT et BAT (Frazier et al., 2018). L'étude des capacités intrinsèques des CSHs du BAT reste à faire. Au regard des derniers travaux il apparaît que l'activité hématopoïétique de l'ensemble des tissus adipeux (WAT ou BAT) pourrait dépendre de sa localisation anatomique plus que du type de tissu adipocytaire. En conclusion, l'ensemble de ces études indiquent que le tissu adipeux est un réservoir fonctionnel de cellules composant l'arbre hématopoïétique.

#### VI.2.b Impact des adipocytes de MO sur l'hématopoïèse

Les adipocytes sont des éléments importants du microenvironnement médullaire. La fonction que le MAT exerce sur l'hématopoïèse est de mieux en mieux comprise depuis la fin des années 2000.

La colonne vertébrale de la souris présente un gradient cranio-caudale de MAT. Afin de savoir si le MAT influence l'hématopoïèse, O. Naveiras et ses collègues ont utilisé ce modèle de gradient en MAT pour étudier l'état et le devenir des cellules hématopoïétiques au contact d'adipocytes médullaires. Les auteurs ont ainsi récupéré les vertèbres thoraciques (pauvres en MAT) et caudales (riches en MATc) des souris C57BL/6 pour évaluer le devenir des cellules hématopoïétiques. Ils ont constaté que les CSPHs (pour Cellule Souche et Progéniteurs Hématopoïétiques) sont **1)** plus rares et **2)** en moins grande proportion en phase S/G2/M du cycle cellulaire dans les vertèbres caudales en comparaison aux CSPHs des vertèbres thoraciques (Naveiras et al., 2009). Outre ces analyses phénotypiques, les auteurs ont montré que la clonogénicité, mesurée en test CFU-C et CFU-S, des progéniteurs hématopoïétiques (PH) issus des vertèbres caudales était moins importante que celle des PH des vertèbres thoraciques. Les LSKs, issues des différents territoires, ne présentent pas de modification de leur proportion dans les phases du cycle cellulaire. En revanche, un enrichissement de la population LSK CD34<sup>low</sup> est détecté dans les vertèbres caudales ce qui coïncide avec une meilleur greffe multi-lignage à long terme observé des LSKs issues des vertèbres caudales par rapport aux vertèbres thoraciques (Naveiras et al., 2009). En accord



**Figure 19 : Effets des adipocytes de MO sur l'hématopoïèse.** **A.** Le MATc des vertèbres caudales inhibe l'hématopoïèse en condition physiologique « steady state ». L'altération de la vascularisation pourrait en être la cause **B.** Selon sa localisation, les adipocytes ont des effets opposés sur la régénération hématopoïétique suite à une myéloablation. Sans distinction de MAT, selon H. Ambrosi et ses collègues, le tissu adipeux altère la régénération hématopoïétique via l'inhibition de l'ostéogenèse. **C.** Effet des adipocytokines sur les CSH. (adapté de Wang H. et al., 2018).

avec la littérature, les phénotypes observés sur les progéniteurs issus des vertèbres caudales se retrouvent aussi dans la partie distale du tibia (riche en MATc). Pour démontrer le rôle des adipocytes, les auteurs ont utilisé une souche de souris nommée A-ZIP/F1 qui ne contient pas d'adipocytes. Ces souris sont dépourvues d'adipocytes puisqu'elle exprime un dominant négatif du facteur de transcription essentiel à l'adipogénèse, le c/EBP $\alpha$  (pour CCAAT-enhancer-binding protein  $\alpha$ ), sous le contrôle du promoteur de Fabp4 spécifique de la différenciation adipocytaire. Grâce à ce modèle, les auteurs montrent que le MATc des vertèbres caudales est nécessaire à la mise en quiescence des CSPHs observée dans les vertèbres caudales (Naveiras et al., 2009). Ces observations se vérifient aussi sur l'hématopoïèse obtenue post transplantation. En effet le conditionnement myéloablatif (chimiothérapie ou radiothérapie) en vue de la transplantation de MO induit une adipogénèse médullaire constituée de MATr. Les auteurs montrent que les souris déficientes en adipocytes (A-ZIP/F1), ainsi que l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de l'adipogénèse, permet d'obtenir une régénération hématopoïétique efficace/productive plus rapidement après transplantation contrairement aux souris « *wild-type* » ou non traitées (Naveiras et al., 2009) (**Figure 19**). Les auteurs spéculent que l'ostéogénèse augmentée dans les souris déficientes en adipocytes apporte le soutien nécessaire à l'hématopoïèse greffée. Ainsi le MATr, induit suite à la myéloablation, présente le même effet sur l'hématopoïèse que le MATc. Limiter l'expansion du MATr lors de transplantation de MO, après myéloablation, améliorerait l'efficacité du greffon à limiter l'aplasie et la pancytopenie observée chez les patients.

L'étude menée par O. Naveiras et ses collègues est confortée par celle menée en 2017 par T. H. Ambrosi et ses collègues. Dans cette dernière, les auteurs montrent dans la souris, que l'adjonction de cellules progénitrices ou précurseurs d'adipocytes altère grandement la capacité des CSPHs à régénérer l'hématopoïèse à court terme (5 semaines post transplantation) (Ambrosi et al., 2017). En utilisant un modèle de fracture osseuse, les auteurs montrent que le facteur DPP4 (pour Dipeptidyl Peptidase 4) sécrété par les populations adipocytaires inhibe la différenciation ostéogénique et par conséquent la minéralisation osseuse. Les auteurs s'accordent à dire que l'ensemble de ce processus est responsable de l'inhibition de l'activité hématopoïétique (Ambrosi et al., 2017) (**Figure 19**). Mais pour définitivement valider cette hypothèse il faudrait savoir si le fait d'inhiber DPP4 au moment de la co-transplantation des cellules progénitrices d'adipocytes avec les CSHs de souris améliore la cinétique de reconstitution hématopoïétique.

Des travaux récents ont permis de distinguer chez la souris, le rôle du MATc et du MATr sur l'hématopoïèse en situation normale ou de stress (i.e. suite à une myéloablation).

Les auteurs montrent que les adipocytes qui apparaissent en grande proportion dans la MO suite à une myéloablation par irradiation (MATr) sont la première source cellulaire de la cytokine Scf (pour Stem Cell Factor) sécrétée dans la MO (Zhou et al., 2017). Le SCF alors sécrété par les adipocytes du MATr est **nécessaire** à la régénération hématopoïétique (**Figure 19**). Dans cette étude, les auteurs confirment que les adipocytes des vertèbres caudales (MATc) sont des régulateurs négatifs de l'hématopoïèse en situation normale mais aussi en situation de stress. Grâce à l'utilisation des souris A-ZIP/F1, les auteurs montrent que la présence d'adipocytes dans les vertèbres caudales est négative pour la vascularisation. Ce dernier point suggère que le MATc est un territoire hypoxique comme mentionné dans le **paragraphe VI.1.e**. Le MATr quant à lui n'a pas d'effet majeur sur la vascularisation. Ainsi les adipocytes composant le MATc et MATr ont des effets opposés à la fois sur l'hématopoïèse mais aussi sur la vascularisation, ces deux phénotypes pouvant être liés (Zhou et al., 2017). Ces données ont été très récemment confortées par l'analyse transcriptomique en single cell RNA Seq du composant stromal de la MO en condition « steady state » comparée à la situation de « régénération hématopoïétique » suite à une myéloablation. Le laboratoire d'A. Aifantis montre que certaines populations stromales LepR<sup>+</sup> qui présentent une signature transcriptomique orientée vers l'adipogenèse sont particulièrement enrichies dans la MO suite à la myéloablation. Conformément à l'étude de B. O. Zhou, cette population cellulaire est celle qui exprime le plus de transcrits de *Scf* dans la MO en condition « steady state » ou de « régénération hématopoïétique » (Tikhonova et al., 2019).

Parallèlement à ces travaux, une étude récente montre que la mise en place d'un régime gras à court terme (4 semaines) chez la souris se traduit par la sortie de quiescence des LT-CSH (Hermetet et al., 2019). Suite au régime gras, les auteurs constatent que le récepteur au TGFβ, le TGFβ-RI, est condensé à la surface des LT-LSK à cause d'une distribution non homogène des radeaux lipidiques auxquels il est associé. Cette distribution membranaire anormale du TGFβ-RI se traduit par un défaut de signalisation de la voie du TGFβ. Associé au régime gras, l'injection concomitante du TGFβ recombinant *in vivo* restaure la quiescence des LT-CSH ainsi que la signalisation du TGFβ. Malgré tout cela ne parvient pas à redistribuer normalement le récepteur TGFβ-RI à la surface des LT-CSHs (Hermetet et al., 2019). Puisque le MAT sécrète du TGFβ, on peut s'attendre à ce que l'allongement de la période de régime gras au-delà d'un mois suffise à accroître le MAT ce qui aurait l'effet de restaurer l'action du TGFβ sur les LT-LSK.

Comme décrit précédemment, les effets des adipocytes de la MO sur l'hématopoïèse intramédullaire sont multiples et ne se résument pas qu'aux effets mentionnés. En effet,



différentes adipocytokines peuvent aussi impacter l'hématopoïèse et plus particulièrement les CSH. Pour exemple l'Adiponectine induit la prolifération des CSHs tout en maintenant leur statut indifférencié. En revanche, l'IL-6 entraîne la différenciation des CSHs (Wang et al., 2018a). Les effets du MATr et du MATc sur l'hématopoïèse tendent à être élucidés. Effectuer le sécrétome ou le single cell RNA Seq de ces deux sites est primordial pour augmenter nos connaissances et élucider l'ensemble des rôles qu'ils exercent sur l'hématopoïèse. Pour conclure, ces études prouvent que les deux tissus adipeux de la MO sont définitivement différents entre eux (**Figure 19**).

### VI.3 Interaction entre le tissu adipeux et les hémopathies

L'obésité est associée à l'émergence de nombreuses pathologies dont les hémopathies. Une méta-analyse menée par S. C. Larsson et A. Wolk met en évidence qu'une surcharge pondérale est associée à un risque augmenté de développer différents types de leucémies (LAL, LMC, LLC, LAM) (Larsson and Wolk, 2008). L'obésité est également un facteur de mauvais pronostic pour une majeure partie des cancers. Il semble que ce soit le cas des certaines hémopathies, par exemple les Leucémies Aiguës Promyélocyaires (LAP) (Castillo et al., 2016). L'analyse clinique menée par A. M. Buttirini confirme que l'obésité est un facteur de mauvais pronostic pour les patients atteints de LAL de plus de 10 ans. Toutes les études menées chez les patients atteints de LAL n'arrivent pas à la même conclusion, malgré tout l'analyse de A. M. Buttirini fait référence étant donné la taille de sa cohorte (4260 patients contre seulement 621 patients pour la seconde plus grande étude) (Sheng and Mittelman, 2014).

#### VI.3.a Le WAT et les hémopathies

Différents laboratoires montrent à quel point les adipocytes du WAT ont un impact sur le développement des hémopathies (LAL inclus). Je prends pour exemples les travaux publiés par différentes équipes qui montrent **1**) que les cellules leucémiques de LAL-B (lignée murine) sont capables d'infiltrer le WAT (Behan et al., 2009) grâce au chimiotactisme lié à CXCL12 sécrété par ces différents tissus du WAT (Pramanik et al., 2013). **2**) que les adipocytes protègent les cellules de lignées murines de LAL-B contre les effets cytotoxiques des agents chimio-thérapeutiques à la fois *in vivo* et *in vitro* (Behan et al., 2009). **3**) que les adipocytes protègent les cellules leucémiques (LAL-B) contre l'effet cytotoxique de la L-asparaginase par la sécrétion de la glutamine. La L-asparaginase est une drogue utilisée en



chimiothérapie conventionnelle qui dégrade l'asparagine et la glutamine, deux acides aminés cruciaux pour la croissance des cellules leucémiques (Ehsanipour et al., 2013).

Outre la protection des LAL-B face aux effets de la L-asparaginase, les adipocytes induisent une protection contre les effets cytotoxiques de la Daunorubicine. La Daunorubicine est, entre autre, un inducteur des ROS. Les ROS conduisent à la génération de lésions de l'ADN génomique et sont des contributeurs majeurs de la cytotoxicité de la Daunorubicine. La co-culture de cellules de lignées de LAL-B avec des adipocytes protège les cellules leucémiques contre l'effet cytotoxique de la Daunorubicine en diminuant l'induction des ROS (Sheng et al., 2016).

Il s'agit là d'une série d'explications qui conforte l'hypothèse selon laquelle les cellules leucémiques sont protégées par le tissu adipeux de la cytotoxicité des chimiothérapies. Mais les mécanismes précédemment cités ne sont pas les seuls à intervenir dans ce phénomène et nécessite d'être encore précisés.

#### VI.3.a.i L'importance des acides gras dans les hémopathies

Les lipides sont essentiels pour l'expansion des tumeurs malignes : ils sont nécessaires à la synthèse des constituants membranaires et servent comme source bioénergétique. Différentes études ont été menées pour évaluer la contribution des acides gras libérés par le tissu adipeux à l'expansion des hémopathies. Dans des expériences menées *in vitro*, les premiers travaux ont montré des effets opposés des acides gras sur l'expansion de cellules du Myélome Multiple (MM) et de la Leucémie Aiguë Promyélocytaire (LAP). L'ajout de certains acides gras (acide linoléique et acide oléique) augmente la prolifération des cellules d'une lignée murine de MM alors qu'ils inhibent l'expansion d'une lignée humaine de LAP (Jöhrer et al., 2015).

Dans les cellules leucémiques de LLC, l'inhibition de CD36 par stratégie de diminution d'expression du transcrit ou par un inhibiteur pharmacologique, induit une inhibition de la consommation des acides gras. Cette inhibition du transport des acides gras s'accompagne d'une augmentation de la proportion de cellules leucémiques en apoptose de façon dose dépendante (Rozovski et al., 2018).

Une étude récente menée avec des prélèvements de patients xénotransplantés chez la souris montre que les cellules leucémiques des LMC et LAM sont capables de coloniser le tissu adipeux blanc (ici celui des gonades, GAT). Les cellules leucémiques retrouvées dans le GAT vont entraîner une lipolyse du tissu adipeux grâce à la sécrétion de protéines pro-inflammatoires. La lipolyse a pour conséquence de libérer des acides gras à la fois localement

mais aussi de façon systémique. Ces deux pathologies sont connues pour présenter des cellules dites « Souches Leucémiques » abrégé CSL. Une partie des CSL des LMC et des LAM expriment CD36 à leur surface ce qui leur octroie une dépendance métabolique aux acides gras. Comparées aux CSL CD36<sup>-</sup>, les CSL CD36<sup>+</sup> présentent une activité mitochondriale plus faible et une accumulation en phase G0 du cycle cellulaire. L'ensemble de ce phénotype leur confère une chimiorésistance. Les CSL CD36<sup>+</sup> présentent dans les LMC et les LAM ont une plus grande capacité à infiltrer le GAT. Ainsi, le GAT représente un sanctuaire chimiorésistant pour les cellules leucémiques (Ye et al., 2016).

Ces différentes études montrent à quel point le relargage des acides gras par le tissu adipeux crée un environnement « permissif » soit pour échapper à la chimiothérapie conventionnelle soit comme source bioénergétique. CD36 est une protéine/transporteur clé à la fois dans les tumeurs solides (comme mentionné dans le **paragraphe II.1.c**) mais aussi dans les hémopathies.

#### VI.3.a.ii Les adipocytokines et les hémopathies

Deux adipocytokines, la leptine et l'adiponectine en particulier, sont désormais reconnues pour leur influence sur la biologie des hémopathies.

L'adiponectine altère l'expansion et induit l'apoptose des cellules leucémiques de MM en activant la voie de signalisation PKA/AMPK (pour respectivement Protein Kinase A et AMP-dependent Protein Kinase) (Medina et al., 2014). D'autre part, cette adipocytokine a pour effet d'induire la diminution d'expression de la protéine de fusion BCR-ABL et d'augmenter ainsi l'effet cytotoxique de l'Imatinib<sup>®</sup> sur les cellules leucémiques de LMC (Tan et al., 2015; Wu et al., 2015). Il est à noter que le taux d'adiponectine retrouvé dans le sérum des patients (LAL et LAM) est significativement plus faible que celui des sujets sains. La réduction du taux d'adiponectine pourrait être due à une diminution de la masse du MAT qui est inversement corrélée à l'infiltration leucémique de la MO (Aref et al., 2013).

La leptine, plus particulièrement la signalisation qu'elle induit à travers son récepteur (LepR), inhibe l'expansion et induit la différenciation des cellules leucémiques de LAL-B et LAL-T. En utilisant des souris transplantées avec des lignées leucémiques de LAL, Z. Lu et ses collègues montrent que la diminution de sécrétion de leptine mène à l'augmentation d'expression du récepteur LepR à la surface des cellules leucémiques (Lu et al., 2017). Dans cette situation, la signalisation induite par le récepteur LepR aboutit à l'augmentation de la transcription du gène suppresseur de tumeur *Prdm1* (pour PR Domain-containing protein 1). La protéine PRDM1 permet le recrutement d'enzymes impliquées dans la dé-acétylation des

histones ce qui aboutit à la répression globale de la transcription. Cette augmentation de la synthèse de PRDM1 est responsable d'une diminution de l'expansion des cellules de LAL et sa diminution d'expression génique par une stratégie de ARN interférant, restaure la croissance leucémique (Lu et al., 2017). Le mécanisme par lequel les cellules leucémiques augmentent l'expression du récepteur LepR n'est pas étudié dans cet article. Cette étude a été menée exclusivement avec des cellules de lignées leucémiques. Nous savons à quel point les PDX reproduisent rarement les phénotypes observés avec des lignées. Il serait judicieux de reproduire ces expériences avec des PDX pour confirmer les effets observés.

Les deux principales adipocytokines semblent donc avoir des effets négatifs sur l'expansion des cellules leucémiques. Pour la leptine cet effet semble être le fruit d'un effet systémique et non dans la niche adipocytaire présente dans la MO.

### VI.3.b Interactions entre les adipocytes de MO et les hémopathies

Les cellules leucémiques sont capables d'infiltrer la MO des patients. L'augmentation du contenu adipocytaire de la MO au cours du vieillissement ou suite à la myéloablation peut promouvoir la leucémogénèse ainsi que participer à la résistance aux traitements. Dans ce contexte, l'interaction des cellules leucémiques avec les adipocytes du MAT est d'une grande importance que ce soit d'un point de vue dépendance énergétique ou chimiosensibilité.

#### VI.3.b.i Le MAT : niche pour les hémopathies

Peu d'articles se sont intéressés à l'implication des adipocytes dans la domiciliation et l'implantation des hémopathies dans la MO. Malgré tout, V. L. Battula et ses collègues ont utilisé un modèle *in vivo* de MO humanisé extramédullaire développé dans la souris NSG (Battula et al., 2013). Pour cela les auteurs injectent des CSM humaines avec des progéniteurs endothéliaux dans du Matrigel<sup>®</sup> en sous-cutanée au niveau des flancs des souris NSG. Les auteurs constatent que la diminution d'expression du facteur CTGF (pour Conjonctive Tissue Growth Factor) dans les CSM entraîne une différenciation adipocytaire importante à la fois *in vitro* mais aussi *in vivo* dans le modèle de MO humanisé. Grâce à ce modèle, les auteurs montrent que les lignées cellulaires humaines de LAL-B et de LAM5 greffent préférentiellement dans la MO extramédullaire riche en adipocytes (Battula et al., 2013). Les auteurs confirment les expressions importantes du CXCL12 et de la Leptine par les adipocytes dérivés des CSM. L'importance du CXCL12 déjà démontré dans le WAT (Pramanik et al., 2013) pourrait être aussi le facteur clé du tropisme des cellules leucémiques pour la MO adipocytaire.

Alors que ces premiers résultats confortent l'idée que le tissu adipeux blanc et médullaire représentent une niche pour les cellules leucémiques, une étude publiée en 2017 démontre que les cellules leucémiques de LAM de patients altèrent le contenu adipocytaire de la MO (Boyd et al., 2017). Le modèle utilisé est la greffe de cellules leucémiques de patients dans des souris NSG afin d'analyser le devenir du tissu adipeux contenu dans les fémurs (MATr) ainsi que celui des vertèbres caudales (MATc). Les auteurs constatent que, associé à l'infiltration leucémique, le MATr et non le MATc diminue à cause d'une altération de la différenciation des CSM en adipocytes (Boyd et al., 2017). De façon intéressante, cette étude montre que l'altération des différenciations myéloïde et érythroïde visualisée à la fois chez le patient et dans le modèle de xéno greffe est liée à l'inhibition de l'adipogenèse du MATr (Boyd et al., 2017). Cette étude montre à quel point l'interaction entre le tissu adipeux médullaire et l'hémopathie est importante au point d'altérer la genèse de cellules hématopoïétiques matures. Ainsi inhiber ces mécanismes est essentiel pour maintenir l'intégrité hématopoïétique des patients et ainsi augmenter la reprise hématopoïétique suite aux traitements des hémopathies.

#### VI.3.b.ii le MAT : une niche de chimiorésistance des hémopathies

Différentes interactions entre les adipocytes de la MO et les hémopathies ont été décrites. Tout d'abord, il est montré que les cellules de Leucémie Aiguë Promyélocytaire (LAP) sont protégées, *in vitro*, par les adipocytes dérivés des CSM en prévenant l'apoptose induite avec des agents utilisés en chimiothérapie (Tétrinoïne ou All Trans Acid Retinoïc, ATRA, et Doxorubicine). Par l'utilisation d'anticorps neutralisant ou de récepteur chimérique inhibiteur, les auteurs montrent que cette chimioprotection est dépendante de la Leptine synthétisée par les adipocytes (Tabe et al., 2004). Y. Tabe montre que les LAM monocytaires (LAMo) cultivées sur des adipocytes dérivés de CSM augmentent l'absorption d'acides gras, l'activation de l'AMPK ainsi que la  $\beta$ -oxydation ce qui se traduit par la diminution de l'activation de la voie de signalisation AKT / mTOR. L'ensemble de ces signaux se traduit par la protection des cellules de LAMo de l'apoptose (Tabe et al., 2017).

La contribution du MAT dans la chimioprotection des cellules du MM est **1)** de réguler l'autophagie ce qui aboutit à une protection contre l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques, **2)** de sécréter de la Résistine protectrice contre les drogues chimiothérapeutiques et **3)** de produire de la Leptine capable d'augmenter la prolifération des cellules leucémiques du MM. Par ailleurs l'intensité d'expression de LepR est prédictive de la réponse aux traitements (Wang et al., 2018a).

D'autre part, les travaux menés par J. W. Behan et E. A. Ehsanipour montrent que les adipocytes dérivés de lignées de MO de souris (la lignée stromale OP9) protègent également les cellules d'une lignée murine de LAL-B des effets cytotoxiques de la Vincristine, la Daunorubicine, la Dexaméthasone et la L-asparaginase (Behan et al., 2009; Ehsanipour et al., 2013). Ces travaux, menés avec des lignées cellulaires, devraient être confirmés avec des échantillons de patients.

La caractérisation du rôle des adipocytes de la MO sur le développement et les mécanismes impliqués dans la résistance des LAL est primordiale. Ce d'autant que la chimiothérapie conventionnelle d'induction utilisée dans le traitement des LAL entraîne une augmentation du nombre d'adipocytes médullaire durant toute la période du traitement d'induction (Nguyen et al., 2015). La maladie résiduelle se retrouve ainsi dans un environnement médullaire très riche en adipocytes. On peut se demander si cet enrichissement en adipocytes de la MO peut contribuer à la mise en place de mécanismes de résistances, comme décrit et discuté dans les paragraphes précédents.

La partie suivante expose les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse. Je vais présenter en premier lieu les résultats publiés dans la revue *Blood Advances*. J'ai effectué mon stage de Master 2 avec Xavier Cahu (doctorant en charge de ce projet). Suite à son départ en 2014, j'ai mené le projet de façon autonome. Ensuite je vous présenterai les résultats les plus pertinents générés suite à la publication de l'article.

## Objectif

---

La leucémie Aiguë Lymphoblastique T (LAL-T) est une pathologie hématopoïétique qui survient au cours de la lymphopoïèse T. cette hémopathie affecte à la fois les adultes et les enfants et représente d'ailleurs 15% des leucémies aiguës lymphoïdes pédiatriques. Les cellules leucémiques infiltrent de nombreux tissus dont la Moelle Osseuse (MO).

L'interaction entre les cellules leucémiques de LAL-T et les différents constituants du microenvironnement cellulaire devient un axe de recherche majeur. Il a été décrit que les cellules leucémiques induisent l'inhibition de la différenciation des cellules souches mésenchymateuse en ostéoblastes, altérant ainsi la niche ostéoblastique (Hawkins et al., 2016; Wang et al., 2016). Bien que contredit récemment, il a été montré également que les cellules leucémiques se localisent au niveau de la niche endothéliale profitant ainsi d'une concentration élevée de CXCL12 (Passaro et al., 2015; Pitt et al., 2015). Enfin, l'échange d'organites tels que les mitochondries a clairement été démontré entre les cellules leucémiques de LAL-T et les cellules stromales mésenchymateuses (Wang et al., 2018b). Cette liste non exhaustive montre à quel point les cellules leucémiques interagissent avec leur environnement proche.

La MO est un environnement très hétérogène. D'un point de vue cellulaire, elle est composée de cellules hématopoïétiques, de fibroblastes, de cellules mésenchymateuses, endothéliales, nerveuses et d'adipocytes.

Comme expliqué dans l'introduction, les adipocytes qui constituent le tissu adipeux médullaires peuvent être classés en deux catégories, le constitutif qui est présent naturellement après la naissance dans l'extrémité des os longs et le régulé qui s'amplifie en réponse à différents stimuli (vieillessement, chimiothérapie, radiothérapie etc).

Les données récentes montrent que les deux tissus adipeux médullaires vont avoir des effets opposés sur la vascularisation ainsi que sur l'hématopoïèse normale. En effet, le tissu constitutif est un facteur qui agit négativement sur la vascularisation ainsi que de l'hématopoïèse alors que le régulé permet le soutien l'hématopoïèse régénérative grâce à la production massive de SCF (Zhou et al., 2017).

Malgré tout qu'il soit constitutif ou régulé, le tissu adipeux est un composant de la MO des sujets sains et des patients qui développent une LAL-T. Divers argument nous laissent penser que le tissu adipeux médullaire peut avoir un rôle important dans la réponse à la chimiothérapie. En effet, au cours du vieillissement la MO devient de plus en plus riche en adipocytes et l'on sait au regard de cela, que les LAL-T de sujets âgés sont beaucoup plus

réfractaire à la chimiothérapie que les sujets jeunes. De plus, les agents utilisés en chimiothérapie sont pour certains des inducteurs de l'adipogénèse dans la MO (Tikhonova et al., 2019). Il a été rapporté également les LAL-T en rechute (dans une MO riche en adipocytes) sont de mauvais pronostic comparées aux LAL-T au diagnostique. L'ensemble de ces arguments aboutit à l'objectif de ma thèse qui a été d'étudier l'interaction entre les cellules leucémiques de LAL-T avec le tissu adipeux médullaire.

Dans un premier temps je vais vous présenter l'article que j'ai publié en co-premier auteur dans Blood Advances puis les résultats non publiés générés depuis la publication de cet article.

# ARTICLE 1

---

Les LAL-T sont hétérogènes d'un point de vue phénotypique, moléculaires et dans leur rapidité à greffer en souris immunodéficientes (Poglio et al., 2015). Dans notre étude nous avons utilisé des LAL-T capables de greffer **rapidement** dans les souris NSG afin d'éviter d'utiliser des échantillons qui présentent une sélection de sous-clones à la suite des transplantations (Poglio et al., 2015).

Les souris présentent un gradient cranio-caudale de la teneur en adipocytes des MO. Ainsi les vertèbres thoraciques des souris présentent une MO dite « rouge » riche en cellules hématopoïétiques et pauvres en adipocytes. Contrairement aux vertèbres thoraciques, les vertèbres caudales dont la MO est dite « jaune » car elles sont riches en adipocytes et pauvres en hématopoïèse (Naveiras et al., 2009). Nous montrons ici, que les cellules leucémiques transplantées dans des souris immunodéficientes (NSG) sont capables d'infiltrer ces deux territoires médullaires. Dans la MO adipocytaire, les cellules leucémiques présentent une perturbation de l'expression des marqueurs de surfaces, une diminution de l'activité mitochondriale qui se traduit par une baisse de la respiration mitochondriale et une accumulation en phase G0 du cycle cellulaire. Cette modification de progression du cycle cellulaire est responsable la chimiorésistance face aux agents chimiothérapeutiques qui ciblent le cycle cellulaire.

Les adipocytes de la MO ne sont pas strictement identiques à ceux qui composent le tissu adipeux blanc. Malgré cela, nous montrons que les cellules leucémiques retrouvées dans le tissu adipeux blanc des gonades (anatomiquement proche des fémurs) partagent des caractéristiques communes avec les cellules leucémiques retrouvées dans les vertèbres caudales. De plus, la co-culture des adipocytes dérivés des cellules stromales mésenchymateuses avec les cellules leucémiques de LAL-T entraîne leur chimiorésistance.

L'ensemble de ces éléments laisse penser que les adipocytes sont responsables de l'éducation des cellules leucémiques.

Enfin, les modifications des cellules leucémiques acquises dans la MO adipocytaire sont complètement réversibles. En effet, les cellules leucémiques extraites des MO adipocytaires perdent « rapidement » leurs caractéristiques, que ce soit en co-culture *in vitro* ou en transplantation *in vivo*.



## Bone marrow sites differently imprint dormancy and chemoresistance to T-cell acute lymphoblastic leukemia

Xavier Cahu,<sup>1-4,\*</sup> Julien Calvo,<sup>1-4,\*</sup> Sandrine Poglio,<sup>1-4</sup> Nais Prade,<sup>5,6</sup> Benoit Colsch,<sup>7</sup> Marie-Laure Arcangeli,<sup>1-4</sup> Thierry Leblanc,<sup>8</sup> Arnaud Petit,<sup>9</sup> Frederic Baleyrier,<sup>10</sup> Andre Baruchel,<sup>8</sup> Judith Landman-Parker,<sup>9</sup> Christophe Junot,<sup>7</sup> Jerome Larghero,<sup>11</sup> Paola Ballerini,<sup>1-4,9</sup> Eric Delabesse,<sup>5,6</sup> Benjamin Uzan,<sup>1-4</sup> and Francoise Pflumio<sup>1-4</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Recherche sur les Cellules Souches Hématopoïétiques et Leucémiques, Equipe Labellisée Ligue Nationale contre le Cancer, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, Commissariat à l'énergie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Fontenay-aux-Roses, France; <sup>2</sup>INSERM, Unité 967, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>3</sup>Université Paris Diderot, Paris 7, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>4</sup>Université Paris Sud, Paris 11, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>5</sup>Laboratoire d'Hématologie, INSERM U1037, Toulouse, France; <sup>6</sup>Université Paul Sabatier, Toulouse, France; <sup>7</sup>Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, CEA–Institut National pour la Recherche Agronomique Unité Mixte de Recherche 0496, Direction de la Recherche Fondamentale/Institut de Biologie et de Technologie de Saclay/Service de Pharmacologie et d'Immunologie, Université Paris Saclay, MetaboHUB, Gif-sur-Yvette, France; <sup>8</sup>Service d'Hémo-Immunologie Pédiatrique, Hôpital Robert Debré, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université Paris Diderot, Paris, France; <sup>9</sup>AP-HP, Service d'Hématologie Pédiatrique, Hôpital A. Trousseau, Paris, France; <sup>10</sup>Service d'Hématologie et Immunologie Pédiatrique, Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, Hôpitaux de Lyon, Lyon, France; and <sup>11</sup>Service de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint Louis, Paris, France

### Key Points

- BM niches differentially support T-ALL.
- BM niches differentially protect T-ALL cells from chemotherapy.

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) expands in various bone marrow (BM) sites of the body. We investigated whether different BM sites could differently modulate T-ALL propagation using *in vivo* animal models. We observed that mouse and human T-ALL develop slowly in the BM of tail vertebrae compared with the BM from thorax vertebrae. T-ALL recovered from tail BM displays lower cell-surface marker expression and decreased metabolism and cell-cycle progression, demonstrating a dormancy phenotype. Functionally, tail-derived T-ALL exhibit a deficient short-term *ex vivo* growth and a delayed *in vivo* propagation. These features are noncell-autonomous because T-ALL from tail and thorax shares identical genomic abnormalities and functional disparities disappear *in vivo* and in prolonged *in vitro* assays. Importantly tail-derived T-ALL displays higher intrinsic resistance to cell-cycle-related drugs (ie, vincristine sulfate and cytarabine). Of note, T-ALL recovered from gonadal adipose tissues or from cocultures with adipocytes shares metabolic, cell-cycle, and phenotypic or chemoresistance features, with tail-derived T-ALL suggesting adipocytes may participate in the tail BM imprints on T-ALL. Altogether these results demonstrate that BM sites differentially orchestrate T-ALL propagation stamping specific features to leukemic cells such as quiescence and decreased response to cell-cycle-dependent chemotherapy.

### Introduction

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a disease of T-cell progenitors that mainly affects children and young adults. Numerous genomic alterations, such as *NOTCH1/FBXW7* mutations, *TLX1/3* overexpression, or *SIL-TAL1* deletion, are known to induce survival, proliferation, and differentiation block in T-ALL cells.<sup>1</sup> Interactions between leukemic cells and their microenvironment also contribute to T-ALL pathogenesis. Cell–cell contacts such as Delta-Like/Jagged-Notch1, integrin LFA1/ICAM1 and secreted factors such as interleukin 7 and 18 or CXCL12 are key players in T-ALL development.<sup>2-7</sup> In the course of the disease, T-ALL cells settle in various environments such as thymus, blood, bone marrow (BM), pleura, or lymph nodes, which differ in terms of cell content, extracellular matrix, and secreted

factors. To which extent these distinct niches imprint niche-specific features on T-ALL cells is not well understood.

BM microenvironment consists of numerous cellular components such as osteoblasts, endothelial sinusoidal cells, and mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) but also hematopoietic cells. BM also contains adipocytes, which are differentiated cells dedicated to store triglycerides. Adipocytes can be found in various areas of the body.<sup>8</sup> The extramedullary adipose tissue is schematically separated into white adipose tissue involved in energy storage, endocrine secretion and mechanical protection, and brown adipose tissue, dedicated to thermogenesis. In BM, adipocyte-poor and adipocyte-rich niches, also called red and yellow marrow, respectively, are commonly described.<sup>9</sup> The adipocyte-poor BM is a primary site for hematopoiesis. Conversely, the adipocyte-rich BM inhibits hematopoiesis and secretes hormones such as adiponectin.<sup>10,11</sup> The adipocyte-rich BM is a dynamic tissue that increases following various injuries such as starvation, irradiation, or chemotherapy.<sup>12,13</sup> The adipocyte-rich BM appears around birth and develops during the first weeks of life in the distal skeleton including hands, feet, and distal tibia in humans and tail vertebrae in rodents, giving rise to constitutive marrow adipose tissue.<sup>14</sup> Later, during childhood and early adulthood, BM adipocytes develop at the expense of adipocyte-poor BM, thus inducing regulated marrow adipose tissue.<sup>14</sup>

In recent years, the interplay between adipocytes and solid cancer has been revealed, with adipocytes promoting the growth of breast, ovarian, and prostate cancer.<sup>15-17</sup> Concerning the relationships between adipocytes and hematological malignancies, Nalm6 B-cell ALL (B-ALL) and Molm13 AML5b cell lines preferentially engraft into ectopic adipocyte enriched BM, whereas the white adipose tissue protects B-ALL from chemotherapy.<sup>13,18-21</sup>

Here we investigated how different BM sites control T-ALL development. We focused on constitutive adipocyte-rich or -poor (and inversely hematopoiesis-poor and -rich) BM<sup>10</sup> and asked whether T-ALL cells exhibit niche-specific genomic, phenotypic, and proliferative features. Using mouse thoracic vertebrae vs tail vertebrae as respective BM models of constitutive adipocyte-poor and -rich BM, we demonstrate that these 2 BM microenvironments imprint niche-specific characteristics on T-ALL cells, associated with modified cell-cycle and metabolism-related chemoresistance.

## Materials and methods

### hT-ALL samples and murine ICN1 overexpressing T-ALL cells

Blood samples from patients with human (h)T-ALL were collected at diagnosis at Hôpital Trousseau, Hôpital Robert Debré (Paris, France), or Hôpitaux Civils de Lyon (Lyon, France). Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. The ethics committee and the Institutional Review Board of INSERM approved the study of hT-ALL (number 13-105-1). Blood mononuclear cells were isolated using Ficoll and subsequently frozen in fetal bovine serum containing 10% dimethyl sulfoxide. Primary hT-ALL samples were used, unless otherwise stated. Patients' characteristics are described in supplemental Table 1. J. Ghysdael kindly provided mouse CD45.2 leukemic cells expressing Notch1 intracellular domain 1 (ICN1).<sup>22</sup>

### Mice

Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency /interleukin-2R $\gamma$  null mice (NSG, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)

are produced in pathogen-free animal facilities (Commissariat à l'énergie Atomique et aux Energies Alternatives [CEA], Fontenay-aux-Roses, France). Leukemic cells from human blood samples were injected intravenously through the retro-orbital sinus of NSG mice without any prior irradiation ( $10^6$  viable cells/mouse). Similarly, CD45.1 C57BL/6 mice (The Jackson Laboratory) received  $10^5$  viable CD45.2 ICN1 cells/mouse. T-ALL was regularly monitored in femur using BM samplings after anesthesia (7.5 mg/mL ketamine and 0.05% xylazine) and analgesia (3  $\mu$ g/mL buprenorphine). All experimental procedures were performed in compliance with French regulations for animal experimentation (animal facility registration number A920322).

### Isolation of thoracic or tail vertebrae

After anesthesia and analgesia, mice underwent transcardial perfusion with phosphate-buffered saline and heparin sulfate (10 U/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) before sacrifice. Thoracic or tail vertebrae starting from the fourth tail segment were removed and carefully cleaned.<sup>10</sup> For standard histology, each thoracic or tail vertebra was fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours, decalcified, dehydrated, embedded in paraffin, cut in 5- $\mu$ m sections with a microtome, and further stained with standard hematoxylin and eosin. Otherwise, each thoracic or tail vertebra (3 to 6 segments per site) were minced with scissors in phosphate-buffered saline. Triglyceride content was determined in the upper phase using an enzymatic-based colorimetric assay (PAP150, BioMérieux, Craponne, France). Whenever needed, hT-ALL cells from thoracic or tail vertebrae were purified using anti-hCD45-PE antibody (eBioscience), anti-PE microbeads, large-size columns, and QuadroMACS separator (all from Miltenyi Biotec).

### Kinetic analysis of T-ALL engraftment into thoracic or tail vertebrae

NSG mice injected with hT-ALL or C57BL/6 CD45.1 mice injected with murine ICN1 cells were analyzed sequentially (2 mice/time point) over time until they showed clinical signs of illness (ruffled hair, hunched back, weight loss). Cells from thoracic or tail vertebrae were recovered and analyzed using flow cytometry to detect hCD45<sup>+</sup>/hCD7<sup>+</sup> T-ALL within Ter119<sup>-</sup> cells. In ICN1-injected C57BL/6 mice, CD45.2<sup>+</sup>/CD45.1<sup>-</sup> ICN1 leukemic cells were assessed in Ter119<sup>-</sup> cells from thoracic or tail vertebrae.

### In vitro cocultures of T-ALL cells with stromal/hMSC/MS5 or stromal/hMSC/MS5-derived adipocytes

Thorax- or tail-derived hT-ALL cells were cocultured with Delta-like 1 expressing MS5 cells (MS5-DL1).<sup>6</sup> A total of  $2 \times 10^5$  T-ALL cells from thoracic or tail BM niches were plated with MS5-DL1 cells in "T-ALL medium," as previously described.<sup>6</sup> Short-term (7 days) and long-term (28 days) cultures were done.

MS5-derived adipocytes and MSC-derived adipocytes were obtained as described in the supplemental Methods and the cocultures were initiated after the MS5/hMSC was differentiated in adipocytes in differentiating adipocyte medium. T-ALL cells were cocultured with MS5/hMSC or MS5/hMSC-derived adipocytes during a 7-day (short term) or a 28-day period (long term).<sup>6,23</sup> Briefly,  $2 \times 10^5$  T-ALL cells/well were suspended in T-ALL medium and plated in triplicate on MS5/hMSC or MS5/hMSC-derived adipocytic stromas in 24-well plates. The medium was changed every other day. Every 7-day culture period, T-ALL cells were harvested and the number of hCD45<sup>+</sup>/hCD7<sup>+</sup> leukemic cells was



evaluated using flow cytometry. T-ALL cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were thereafter replated on new MS5/hMSC or MS5/hMSC-derived adipocytic stromas in fresh T-ALL medium.

### Engraftment of thoracic- or tail BM-derived T-ALL cells in secondary mice

hT-ALL cells were isolated from thoracic or tail vertebrae and the same number of T-ALL cells from each condition was injected into secondary nonirradiated NSG mice. T-ALL engraftment was monitored in femur BM until engraftment was >90% or mice displayed any sign of illness.

### T-ALL sensitivity to chemotherapy

T-ALL cells were cocultured with MS5 or MS5-derived adipocytes for 3 days in T-ALL medium.<sup>6</sup> Vincristine sulfate (0, 1, or 10 nM), cytarabine (500 nM), or dexamethasone (200 nM) (Sigma-Aldrich) were subsequently added to the coculture during a 72-hour period. Cells were harvested and apoptosis was evaluated among hCD45<sup>+</sup>/hCD7<sup>+</sup> cells using Annexin V-Hoechst staining. Vincristine-induced apoptosis represents apoptosis (Annexin V<sup>+</sup> cells) with vincristine minus spontaneous apoptosis (no vincristine) in the same territory.

The intrinsic sensitivity of adipocyte-rich and adipocyte-poor T-ALL cells to chemotherapy was studied with hT-ALL isolated from thoracic and tail vertebrae and grown for 72 hours without stromal cells in T-ALL medium containing vincristine sulfate, cytarabine, and dexamethasone.<sup>6</sup> Apoptosis was evaluated using flow cytometry in thorax- or tail-derived hCD45<sup>+</sup>/hCD7<sup>+</sup> cells. Results are expressed in fold increase of apoptosis (% Annexin V<sup>+</sup> cells) with vincristine compared with spontaneous apoptosis (no vincristine).

### Cellular respiration and glycolysis

Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were measured using an XFp Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA). Detailed information is provided in the supplemental material.

### Quantification of mitochondria mass and membrane potential

Leukemic cells were incubated with 50 nM Mitotracker Green (MTG, M7514, ThermoFisher Scientific) and 100nM TetraMethylrhodamine methyl Ester (TMRE, T669, ThermoFisher Scientific) for 30 minutes at 37°C. Control negative cells are MTG+TMRE-treated cells incubated with carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (2920, Sigma-Aldrich) at 50  $\mu$ M 15 minutes before the end of the staining process. Analyses were done using a FACSCanto (BD Bioscience). The corrected values correspond to mean fluorescence intensity (MFI) of treated cells minus MFI of carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone-negative control. Other methods are provided in the supplemental material.

## Results

### T-ALL development depends on the studied BM niche

We compared leukemic infiltration in vertebrae localized at 2 distinct levels (thoracic and tail) of the mouse vertebral column that displays a craniocaudal adipocyte gradient.<sup>10</sup> In accordance with the literature, we observed in noninjected NSG mice that the thoracic vertebrae are filled with many hematopoietic mCD45<sup>+</sup> cells and have low triglyceride content, whereas tail vertebrae contain only few mCD45<sup>+</sup> cells and high triglycerides (Figure 1A). As a comparison,

thoracic BM cell content resembles the femur BM (supplemental Figure 1A). T-ALL development was measured using sequential tail and thorax BM analyses after hT-ALL cell injection into NSG mice (Figure 1B-C; supplemental Figure 1B-C). Both the percentage and the absolute number of leukemic cells were significantly lower in tail compared with thoracic segments (Figure 1B-C), highlighting a delayed T-ALL cell infiltration in the tail niche. To avoid any misleading conclusion drawn from the xenograft model, T-ALL cell infiltration was also monitored in thoracic and tail BM using murine ICN1-induced T-ALL cells injected into syngeneic C57BL/6 mice (supplemental Figure 1D). Although ICN1 cells could develop in tail BM, the tail infiltration was significantly decreased and delayed compared with thoracic BM. Overall, T-ALL cells infiltrate all BM sites, but T-ALL expansion is strikingly delayed in the adipocyte-rich/hematopoiesis-poor tail BM compared with the other studied BM site, irrespective of the human/mouse T-ALL model.

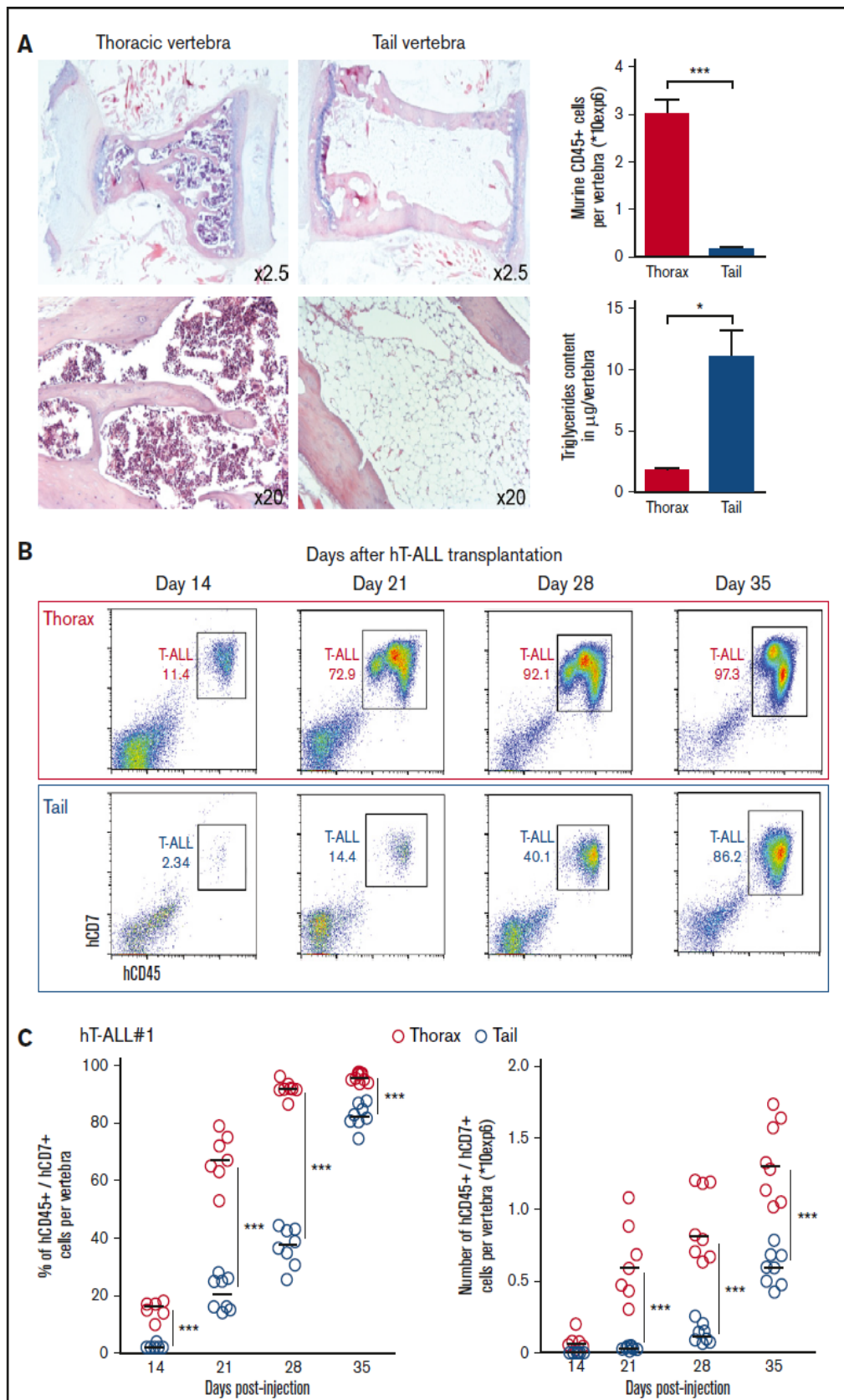
### T-ALL cells display niche-specific cell-surface phenotype but similar genomic abnormalities in thoracic and tail BM

We next characterized T-ALL cells from thoracic, femur, and tail niches in terms of cell-surface markers. hT-ALL cells displayed a distinct cell-surface phenotype in thoracic and tail BM, whereas femur- and thorax-derived cells were similar. Leukemic cells from the tail BM had a decreased forward and side scatter and expressed significantly lower CD7, CD1a, CD3, TCR $\alpha\beta$ , CD4, CD8, CD49d, CXCR4, and CD31 surface expression but increased CD44 surface expression compared with thoracic BM (Figure 2A-B; supplemental Figure 2A-B), whereas thorax- and femur-derived T-ALL had comparable cell-surface marker levels (supplemental Figure 2C). Similar results were observed in the murine ICN1 model: the tested cell-surface marker expression was different in thoracic and tail BM-derived cells (supplemental Figure 2D).

These niche-specific T-ALL characteristics may either be induced by the distinct microenvironment in tail/thoracic BM (noncell autonomous) or result from the selection of distinct clones in those niches (cell autonomous). To distinguish between these 2 hypotheses, we performed comparative genomic hybridization (CGH) analysis of T-ALL cells isolated from thoracic and tail BM. In hT-ALL#1, leukemic cells exhibited the same *SIL-TAL1*, *CDKN2A*, and *RB1* deletions in thoracic and tail niches (Figure 2C). Similarly, cytogenetic defects of hT-ALL#2 and #4 were perfectly matched in thoracic and tail BM (supplemental Table 3). *NOTCH1* mutations were also identical in hT-ALL cells isolated from thoracic and tail niches (Figure 2D; supplemental Figure 3); no *FBXW7* mutation were detected in hT-ALL#1, #2, or #4, whatever their BM origin (data not shown).<sup>1</sup> These similar genomic results were confirmed for the hT-ALL#1 sample using whole exome sequencing (WES; data not shown). Altogether, these data indicate that T-ALL cells from thoracic or tail BM are phenotypically different but genomically similar, questioning the impact of the BM sites on T-ALL characteristics.

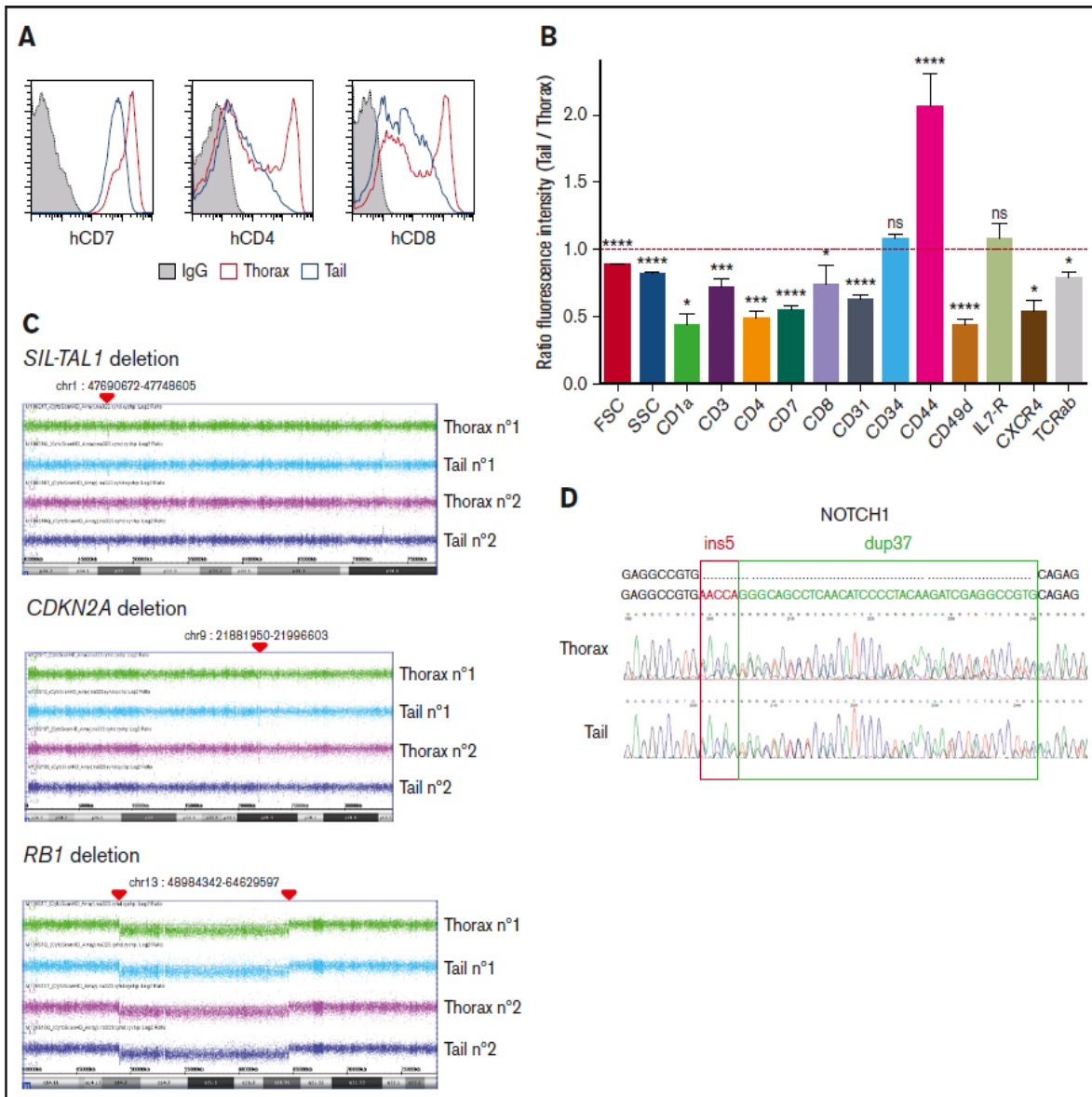
### Tail-derived T-ALL phenotype and growth features fade away during ex vivo cultures

To track down the role of the microenvironment in T-ALL development, thoracic- and tail-derived hT-ALL cells were isolated and their growth studied in identical ex vivo conditions using cocultures with MS5-DL1 stromal cells.<sup>5,23</sup> In short-term cocultures (ie, evaluated 7



**Figure 1. Kinetics of hT-ALL#1 engraftment in thoracic and tail vertebrae BM.** (A, left) Hematoxylin and eosin histology staining of thoracic or tail vertebrae from NSG mice. (A, right) Absolute number of murine CD45<sup>+</sup> hematopoietic cells per thoracic or tail vertebra (n = 15 per site) and triglyceride content of thoracic or tail vertebra (n = 4 per site).



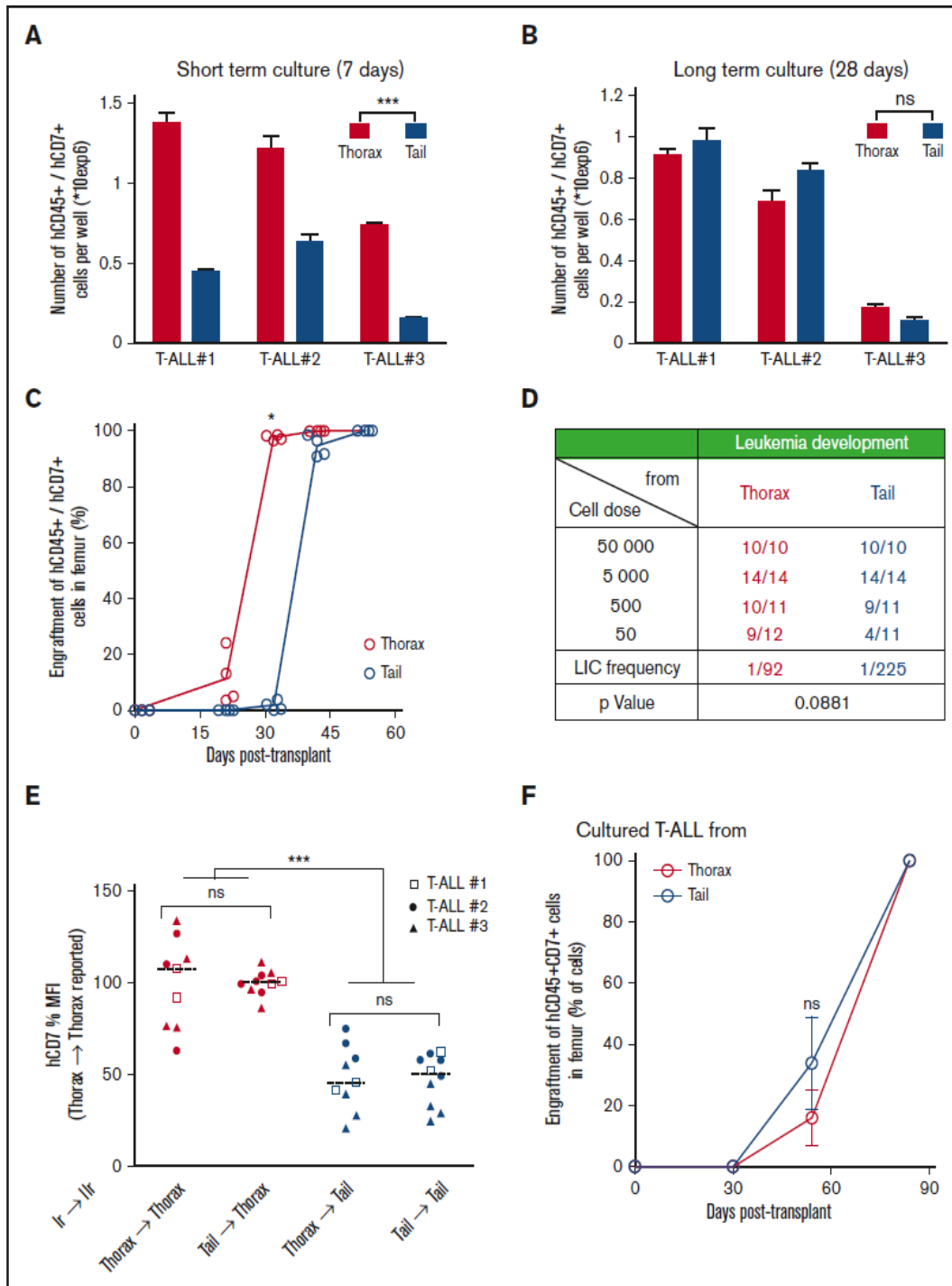


**Figure 2. Phenotype and genomic analyses of tail- and thorax-derived T-ALL.** (A) Phenotype comparison of human CD45<sup>+</sup> T-ALL isolated from thorax (red line) and tail (blue line) vertebrae from hT-ALL#1. Shown are results from a representative mouse. Other examples are shown in supplemental Figure 2. (B) Ratio fluorescence intensity (RFI) in hT-ALL from tail- vs thorax-derived BM. RFI was calculated using the MFI of tail-derived hT-ALL divided by the MFI of thorax-derived hT-ALL cells. Five hT-ALL (#1-#5) tested, 16 to 20 mice per cell-surface marker. Mean values ( $\pm$  standard error of the mean [SEM]) are indicated. (C) CGH arrays of purified thorax- or tail-derived hT-ALL#1 cells. A 58-kb *SIL-TAL1* deletion on 1p32 and 1p33 loci, homozygous *CDKN2A* deletion on 9p21.3 locus, and homozygous *RB1* deletion followed by an heterozygous 54-Mb deletion between 13q14 and 13q21 loci. Representative of 2 mice. CGH arrays of hT-ALL#2 and #4 are provided in supplemental Table 3. (D) Sanger sequencing of NOTCH1 (exon 27) in thorax- and tail-derived hT-ALL#1 (list of primers provided in supplemental Table 2). NOTCH1 mutations of hT-ALL#2 and #4 are provided in supplemental Figure 3. \* $P < .05$ ; \*\*\* $P < .001$ ; \*\*\*\* $P < .0001$ ; ns, not significant (Mann-Whitney  $U$  test).

days after starting the assay), the ex vivo production of leukemic cells from tail-derived hT-ALL was significantly lower than that obtained from thorax-derived hT-ALL cultures (Figure 3A), suggesting a short-term, niche-specific imprints on T-ALL growth. When the

ex vivo growth of hT-ALL cells was extended for 3 additional weeks (ie, up to day 28), thoracic- and tail BM-derived hT-ALL cells produced similar numbers of cells (Figure 3B). Moreover, the phenotype of thoracic and tail BM T-ALL cells also became similar

**Figure 1. (continued)** (B) Flow cytometry plots of hT-ALL#1 engraftment in thoracic or tail vertebrae as a function of time. (C) Kinetic analysis of hT-ALL#1 engraftment in thoracic or tail BM after injection of  $10^6$  primary hT-ALL cells per mice. (Left) Percent of leukemic cells. (Right) Absolute leukemic cell numbers. Two mice (3 to 6 vertebrae per niche and per mice) were euthanized per time point until signs of illness were observed. hT-ALL infiltration was evaluated among Ter119<sup>-</sup> cells. Other kinetic analyses are provided in supplemental Figure 1B-C. Statistics are calculated according to nonparametric Mann-Whitney  $U$  test (\* $P < .05$ ; \*\*\* $P < .001$ ).



**Figure 3. T-ALL characteristics are under BM niches influence.** (A) Leukemic cell production starting from freshly purified hT-ALL cells derived from thoracic or tail vertebrae BM after short-term (left; day 7) or (B) long-term (right; day 28) coculture with MS5-DL1 stromal cells. Shown are means  $\pm$  SEM of triplicate cultures. (C) Kinetic of leukemia development in secondary mice after transplantation of 500 hT-ALL#1 cells recovered from thorax (red) and tail (blue) vertebrae. Secondary transplantations of hT-ALL#2 and hT-ALL#3 are provided in supplemental Figure 3. (D) Limiting dilution transplantation of 3 hT-ALL (#1-#3) isolated from thoracic or tail BM into secondary mice (from  $5 \times 10^4$  cells to 50 cells per mouse). T-ALL development was monitored using iterative femur samplings. Positive mice contain more than 90% hCD45<sup>+</sup>/hCD7<sup>+</sup> T-ALL cells. (E) Human hCD7 cell-surface expression of hT-ALL recovered in tail and thorax vertebrae from secondary mice (lr, 19 mice) transplanted with hT-ALL isolated from primary (lr) mouse tail and thorax. (F) Thorax- and tail-derived hT-ALL#1 cells were grown in coculture with MS5-DL1 cells for 12 days before transplantation into secondary mice (500 cells/mouse, 4 mice/niche). Kinetic of hT-ALL engraftment in the femurs of mice is shown. Representative of 2 experiments. Mean data ( $\pm$  SEM) are indicated. Statistics are calculated according to nonparametric Mann-Whitney *U* test (\**P* < .05; \*\*\**P* < .001).

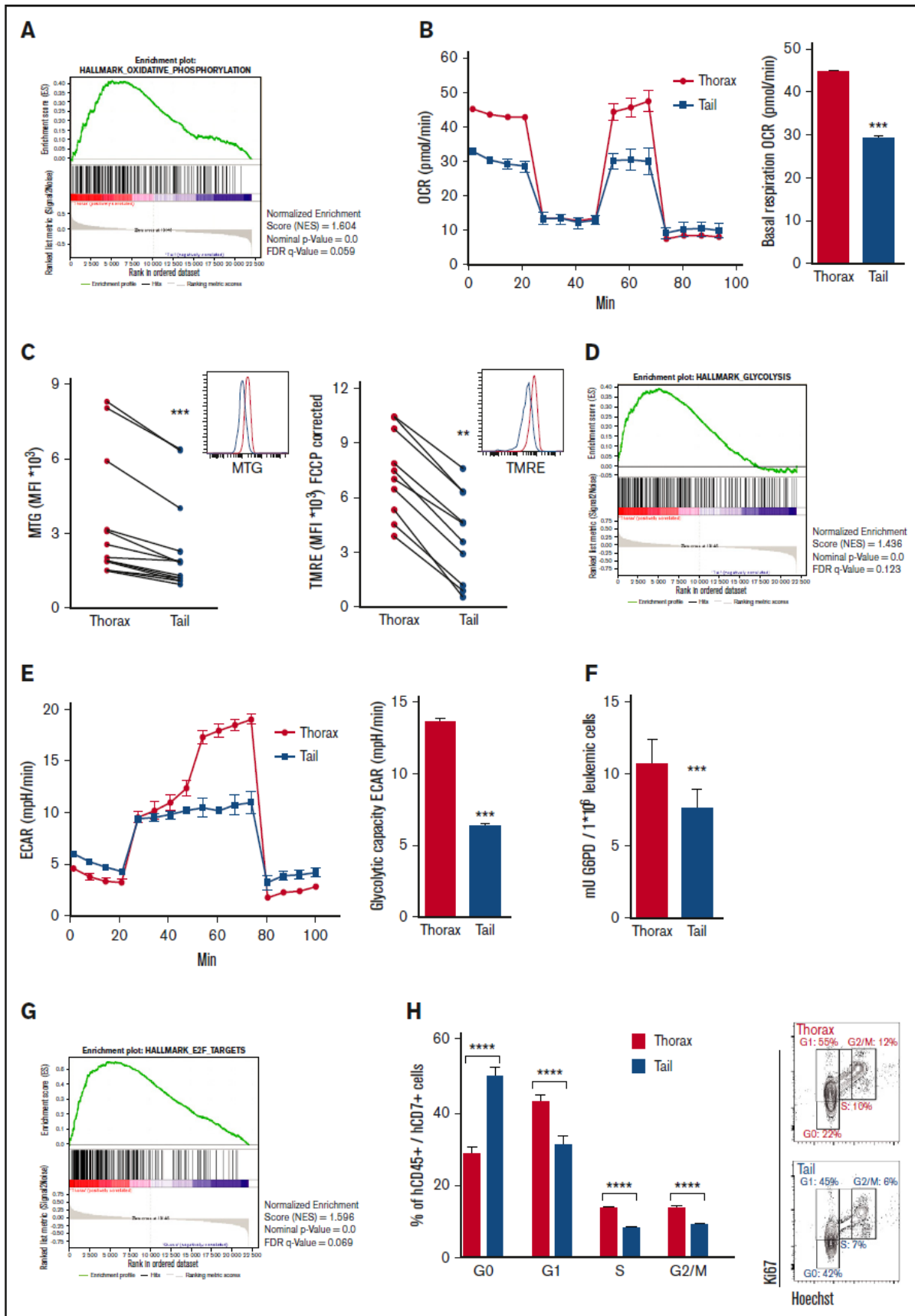


Figure 4.



after the 28-day ex vivo period, contrasting with the niche-specific T-ALL phenotypes observed when the cells had been recovered from mouse BM (supplemental Figure 4). Interestingly, a comparable phenotype between thorax- and tail-derived T-ALL cells was observed as early as day 12 after the start of the ex vivo coculture for one tested T-ALL (supplemental Figure 4C), indicating the phenotype switch occur rapidly in a permissive microenvironment.

### Niche-dependent T-ALL features are recapitulated after secondary transplants

The question of the niche imprints on T-ALL phenotype and growth was further explored after secondary transplants of xenografted cells isolated from the primary tail and thorax vertebrae. We observed that both thorax- and tail-derived T-ALL cells could infiltrate tail and thorax vertebrae and femurs (Figure 3C-E). A kinetic of femur BM samplings indicated that tail-derived cells have a delayed infiltration ability compared with thorax-derived cells and a limiting dilution analysis showed a twofold, albeit not significant, diminished ability to invade secondary BM femur (Figure 3C-D; supplemental Figure 5A). These characteristics resulted in prolonged survival of mice transplanted with tail-derived T-ALL (supplemental Figure 5B). When analyzing T-ALL cells from thorax and tail vertebra in secondary mice, we found that the phenotype of cells was independent of the primary BM of origin but rather relied on the secondary BM site to which the cells had migrated. As an example, hCD7 expression measured on tail-derived T-ALL cells was always lower than the one measured on thorax-derived T-ALL cells whatever thoracic- or tail-primary site the cells originated from (Figure 3E; supplemental Figure 5C). Importantly, when secondary transplants were done with thorax- and tail-derived cells precultured 12 days in contact with MS5-DL1 stromal cells, leukemia development and mouse survival were no longer different whatever BM sites the cells came from (Figure 3F; supplemental Figure 5D), indicating that the original BM imprint on growth and phenotype of T-ALL was gradually lost upon immersion in a permissive microenvironment. Thus, T-ALL niche-specific growth and phenotype are noncell-autonomous features induced by the BM microenvironment.

### T-ALL recovered from different BM niches display niche-specific metabolism and cell cycle

Thorax- and tail-derived hT-ALL was next characterized in terms of gene expression using human-specific Affymetrix gene arrays (supplemental Figure 6). Of the different activated pathways, there was a significant enrichment for oxidative phosphorylation (OXPHOS) in hT-ALL from thorax BM (Figure 4A). Because OXPHOS includes the mitochondria electron transport chain, we

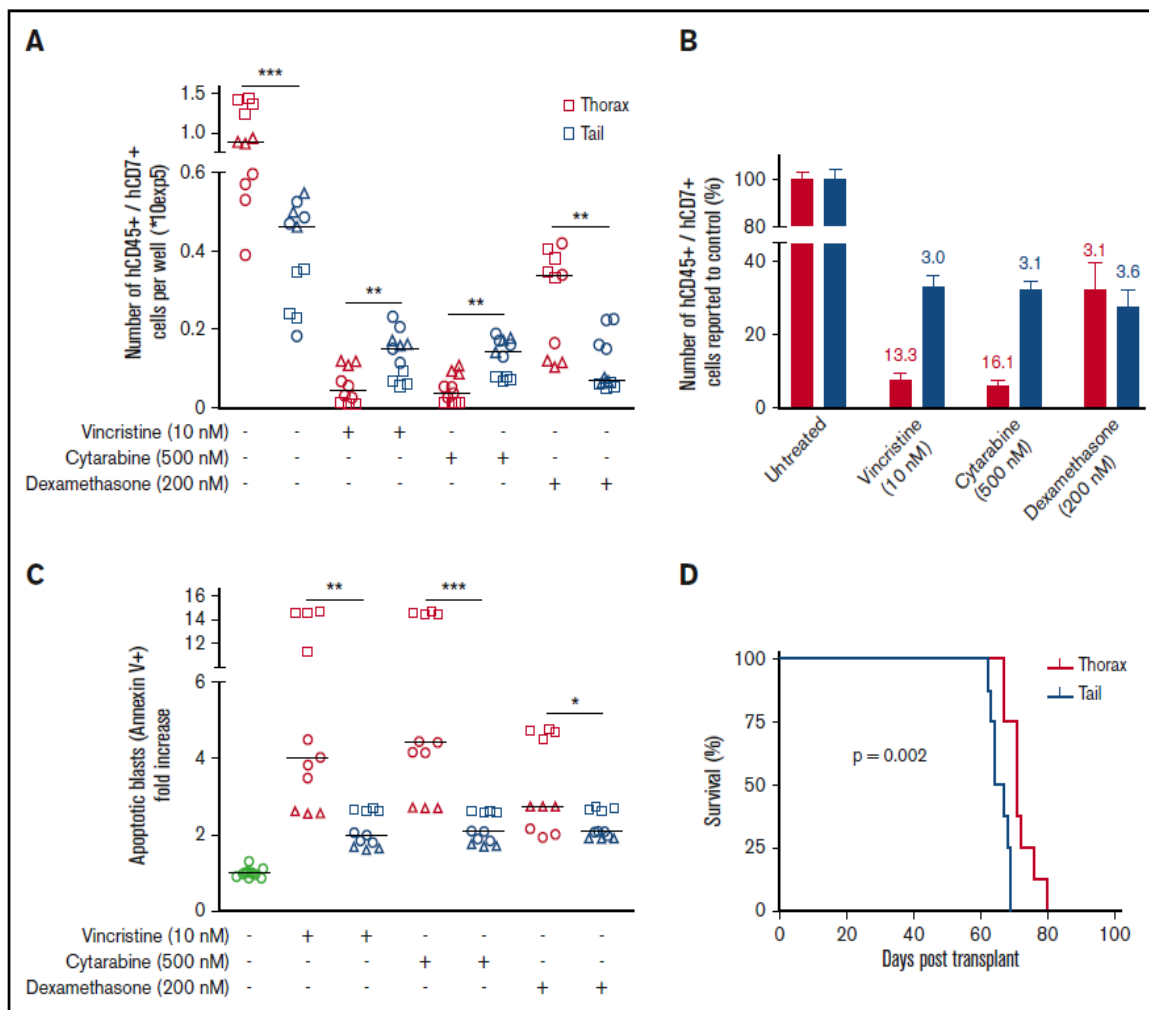
measured OCR in T-ALL from thorax and tail. Results show very similar OCR profiles in T-ALL recovered from both BM sites, although the basal OXPHOS was significantly lower in tail compared with thorax-derived hT-ALL (Figure 4B), suggesting tail-derived cells are resting. These results were related to lower mitochondrial mass as shown using MTG accumulation in mitochondrial matrix (Figure 4C, left), but also to weaker activity or weak polarization of mitochondria membrane in tail vs thorax-derived hT-ALL (Figure 4C, right). Interestingly, microarray analyses also pointed to glycolysis differences in T-ALL from thorax and tail BM (Figure 4D). These results were confirmed by measuring the glycolytic capacity of the BM-derived T-ALL, with the glycolytic reserve being absent from tail-derived T-ALL, whereas their basal glycolysis looks normal (Figure 4E). Moreover, the enzymatic activity of G6PD, a major enzyme implicated in the pentose phosphate pathway and one of the top differentially expressed genes of the glycolysis signature, was diminished in tail- vs thorax-derived hT-ALL (Figure 4F). Finally, gene array analyses indicated an enrichment of E2F targets in thorax- vs tail-derived hT-ALL, suggesting cell-cycle modifications in thorax and tail hT-ALL (Figure 4G), which were further confirmed by enhanced E2F1 expression levels in thorax compared with tail hT-ALL (supplemental Figure 7A) and cell-cycle progression profiles. Thorax-derived cells were actively proliferating, whereas tail-derived cells were more frequently in the G0 state of the cell cycle (Figure 4H; supplemental Figure 7B-C). Last, microarrays highlighted an increased activated apoptotic pathway in the tail-derived niche. MCL1 expression levels and Hoechst/Annexin V labeling confirmed this higher apoptosis in tail-derived hT-ALL even though the survival remained >80% in both territories (supplemental Figure 8). Altogether, these results show that BM niches impinge differently on proliferation and metabolism of leukemic cells with tail/adipocyte-rich BM-derived hT-ALL being low cycling and metabolically less active cells. As expected from the results presented previously, the tail-derived impact on T-ALL was reversible during cocultures with MS5-DL1 stromal cells (supplemental Figure 9), further supporting the microenvironment imprints on leukemic cell growth.

### T-ALL recovered from tail and thorax BM niches have different chemoresistance

Because tail-derived hT-ALL cells display a decreased cell-cycle progression and a low metabolism, we speculated that their intrinsic sensitivity to drugs might be different compared with thorax-derived hT-ALL cells. Leukemic cells isolated from thoracic or tail vertebrae were maintained 72 hours in complete medium containing 10 nM vincristine sulfate, 500 nM cytarabine, or 200 nM dexamethasone. We observed that tail-derived hT-ALL cells display a lower sensitivity to cell-cycle-related vincristine

**Figure 4. Microarray expression analyses reveal the low mitochondrial respiration, low glycolysis, and delayed cell-cycle progression of tail-derived hT-ALL.** Microarrays of thorax- or tail-derived hT-ALL were performed in 3 hT-ALL (#1, #3, #10). (A) Gene set enrichment analysis (GSEA) (Affymetrix arrays) for hallmark oxidative phosphorylation in thorax- or tail-derived hT-ALL. (B, left) OCR measured in thorax- and tail-derived hT-ALL#1 using XFp Analyzer (Seahorse Bioscience). (B, right) Basal respiration (OCR) for 4 experiments. (C, left) Comparison between MFI of MTG from thorax- and tail-derived hT-ALL (4 hT-ALL, 14 mice). (C, right) Comparison between MFI of TMRE from thorax-derived and tail-derived hT-ALL (2hT-ALL, 10 mice). (D) GSEA for Hallmark glycolysis in thorax-derived or tail-derived hT-ALL. (E, left) ECAR measured in thorax- and tail-derived hT-ALL#1 using XFp Analyzer. (E, right) Glycolytic capacity (ECAR) for 2 hT-ALL. (F) Comparison between G6PD activity in thorax- and tail-derived hT-ALL#3 for 3 mice. (G) GSEA for hallmark E2F targets in thorax- or tail-derived hT-ALL. (H, left) Leukemic cells in G0, G1, S, and G2/M phases across hT-ALL samples (6 hT-ALL, 20 mice). (H, right) Ki67-Hoechst cell-cycle analysis by flow cytometry for thorax- or tail-derived hT-ALL#1. Statistics are calculated according to nonparametric Wilcoxon or Mann-Whitney *U* test (\*\**P* < .01; \*\*\**P* < .001; \*\*\*\**P* < .0001). FDR, false discovery rate.



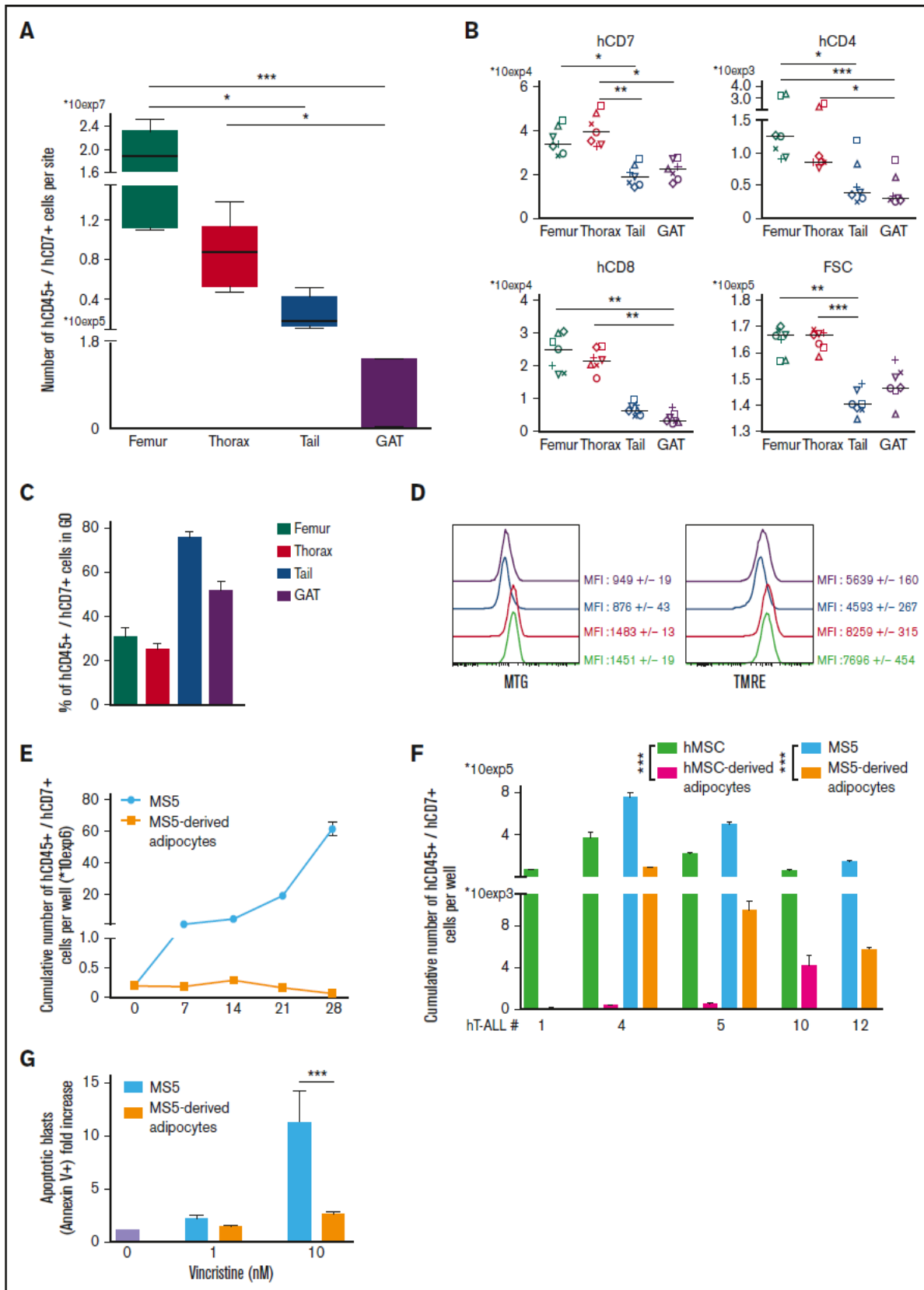


**Figure 5. BM niches influence chemosensitivity of hT-ALL.** (A) Absolute numbers of hT-ALL recovered after in vitro treatment of thorax- and tail-derived T-ALL during 72 hours with 10 nM vincristine, 500 nM cytarabine, or 200 nM dexamethasone. Results are from 3 hT-ALL (#1-#3) individually cultured as tri- or quadruplicates. The line shows median cell numbers. (B) Same results calculated as fold decrease compared with untreated conditions. (C) Apoptosis levels in T-ALL cells treated (+) or not (-) with vincristine, cytarabine, or dexamethasone. Shown are apoptotic cell increases (in fold) relative to untreated thorax- or tail-derived hT-ALL cells. (D) Survival of secondary mice transplanted with 1300 to 13 000 cells/mouse following 72 hours in vitro treatment with 10 nM vincristine. Results are from 8 mice/group, hT-ALL#1. Statistics are calculated according to log-rank (Mantel-Cox) test (D) or nonparametric Mann-Whitney *U* test (\**P* < .05; \*\**P* < .01; \*\*\**P* < .001).

and cytarabine drugs compared with thorax-derived hT-ALL cells. Such results were not observed for dexamethasone. Indeed, significantly higher cell numbers were recovered from the vincristine and cytarabine conditions in the case of tail- compared with thorax-derived hT-ALL (Figure 5A-B) as well as lower drug-induced apoptosis (Figure 5C) although these levels remained low (<15%), as documented previously (supplemental Figure 8). When thorax- and tail-derived T-ALL cells were grown 72 hours in 10 nM vincristine and transplanted at equal numbers in secondary immunodeficient mice, (1) tail- and thorax-derived treated hT-ALL cells were able to re-initiate leukemia in vivo and (2) mice receiving vincristine-treated tail-derived cells succumbed 10 days before those injected with thorax-derived cells (Figure 5D), indicative of lower tail-derived hT-ALL sensitivity to vincristine. Altogether, the effect of vincristine sulfate was more drastic on thorax-derived hT-ALL cells compared with tail-derived hT-ALL cells, indicating tail BM protects hT-ALL from chemotherapy.

### T-ALL isolated from other adipocyte niches share common features with tail-derived hT-ALL including drug-resistance

With tail vertebrae being full of adipocytes (Figure 1A), we investigated whether another adipocyte niche would similarly imprint on T-ALL. We studied T-ALL infiltration in the gonadal adipose tissue (GAT) and observed that, as in tail BM, few leukemic cells are detected compared with any of the studied BM sites (Figure 6A). Phenotype analysis outlined similar decreased surface marker expression in GAT- and tail-derived hT-ALL cells that differ from femur- and thorax-derived hT-ALL (Figure 6B). This was observed although BM and GAT adipocytes are not strictly similar: BM adipocytes share characteristics of white and brown adipocytes and GAT is a white adipocyte tissue.<sup>24</sup> Importantly, cell cycle and the metabolic state of GAT- and tail-derived hT-ALL cells were similarly altered compared with the other BM sites (Figure 6C-D).



**Figure 6. ht-ALL from gonadal adipose tissue and recovered from cocultures with adipocytes share similar features with tail-derived ht-ALL.** (A) Leukemic cell numbers recovered from femur, thorax vertebrae, tail vertebrae, and GAT <2 months after ht-ALL#1 transplantation. Shown are boxplots  $\pm$ SEM of 7 mice receiving  $5 \times 10^4$  leukemic cells. (B) Levels of cell-surface expression of hCD7, hCD4, and hCD8 markers on ht-ALL#1 recovered from femurs, thorax, tail, and GAT of NSG engrafted mice. Statistics

These results show that GAT-derived hT-ALL share many characteristics with tail-derived hT-ALL. We also explored the adipocyte influence on leukemic cell behavior during T-ALL cocultures in the presence of adipocytes derived from the differentiation of mouse stromal MS5 cells or of human MSC. We observed that T-ALL cells poorly grow upon cocultures with adipocytes, either from murine or human origin, albeit the rich cytokine containing T-ALL medium<sup>6</sup> was added to the cultures (Figure 6E-F). T-ALL grown in such conditions had variable cell-cycle progression and did not differ in phenotype compared with cocultures with undifferentiated MS5 cells (supplemental Figure 10A-B), suggesting that in vitro conditions do not faithfully recapitulate the in vivo niche situation. Because BM adipocytes might protect hT-ALL from chemotherapy, we assessed T-ALL sensitivity to 1 and 10 nM of vincristine during cocultures with MS5 or MS5-derived adipocytes. Vincristine-mediated apoptosis was lower when leukemic cells were grown with MS5-derived adipocytes compared with MS5 cells (Figure 6G), thus demonstrating that BM adipocytes may take part in hT-ALL chemoresistance observed in the adipocyte-rich tail BM.

## Discussion

Here we demonstrate that different BM sites induce specific survival, metabolism, cell-cycle progression, and phenotype in T-ALL, resulting in a decreased chemosensitivity of tail-derived T-ALL cells. Tail BM is a constitutive marrow adipose tissue in rodents resembling adipocyte-rich BM found in hands, feet, or distal tibia in humans.<sup>14</sup> Besides, thoracic BM mirrors classical adipocyte-poor BM and T-ALL features are highly similar in thoracic and femoral BM in mice. Studying leukemia propagation in those BM sites, we show that the timing of T-ALL growth is niche specific. The decreased proliferation and/or increased quiescence in adipocyte-rich BM are likely to explain this delayed development. The distal localization of constitutive adipocyte-rich BM and/or a specific vascularization of this territory may also play a role, at least in the early steps. In this respect, distal constitutive adipocyte-rich BM resembles metastatic areas found in solid cancers, in which circulating cancer cells display a low survival but an increased quiescence during latent metastasis.<sup>25</sup> Data obtained in vitro using cocultures and in vivo in GAT suggest that adipocyte-rich tail BM is an inhospitable niche for T-ALL cells, where adipocytes could influence T-ALL features. Whether there are negative signals mediated through secreted molecules/cytokines or high nutrient uptake by adipocytes remains to be addressed. It could also be argued that adipocytes lack positive signals, such as IL7, Notch activation, or glucose deprivation, and/or that other T-ALL supportive cells (MSC, endothelial cells) are missing or different from thorax BM sites, resulting in a low stimulation of T-ALL. For instance, vascular or perivascular niche may differently influence T-ALL propagation in the thorax and tail BM; future experiments will have to address this point. Meanwhile, and contrary to in vitro results, T-ALL develops in tail BM, suggesting that T-ALL somehow overcomes the niche situation in the course of T-ALL propagation.<sup>25</sup>

Our results show that T-ALL genomic profiles are identical in leukemic cells isolated from thoracic and tail niches. And even though the latter techniques may have failed to detect any niche-specific mutation, thorax- and tail-derived leukemic cells exhibit similar growth after long term ex vivo coculture. Also, the entire thoracic and tail leukemic populations, but not subpopulations, recover identical expression of several cell-surface markers as early as day 12, further arguing against any ex vivo clonal selection. Last, propagation into secondary mice becomes similar when thorax- and tail-derived T-ALL cells are grown for 12 days in the same ex vivo environment. Altogether, these results strongly support that the BM microenvironment provides a cell-extrinsic education of the leukemic cells independently of their cell-intrinsic genetics.<sup>26</sup> In everyday medical practice, leukemic infiltration and molecular and phenotypic characteristics are usually inferred from leukemic cells sampled from blood, sternum, or iliac crest BM. Our data clearly show that proliferative and phenotypic data obtained from these specific environments cannot be generalized to all niches. Although our genomic data suggest that sternal/ilic crest molecular features can be generalized to slow-cycling niches, we cannot exclude intrinsic differences not detected by the WES technique. Also, xenografting human leukemia selects cells, sometimes in the minority at diagnosis, share genomic or transcriptomic characteristics with relapse cells.<sup>27</sup> Whether the clonal architecture is strictly identical in human slow-cycling and high-cycling BM niches remains to be proven, especially in more oligoclonal samples.<sup>28</sup>

Genomic alterations induce a T-cell differentiation block and genome-specific cell-surface phenotype.<sup>29</sup> In our study, we show that the niche also promotes a specific cell-surface phenotype. The T-ALL cell-surface phenotype is therefore the complex result of genomic and niche parameters, indicating a high plasticity of blast cells in response to the in vivo or in vitro microenvironment.<sup>30</sup> Although hCD7<sup>+</sup>/hCD34<sup>+</sup> or hCD7<sup>+</sup>/hCD1a<sup>-</sup> T-ALL cell fractions are enriched in hT-ALL initiating capacity,<sup>31,32</sup> it is likely that the microenvironment in which T-ALL cells are immersed before transplantation may contribute to the leukemia initiating capacity, bringing into question the fidelity of surface markers to universally identify hT-ALL initiating capacity.

Finally, our data demonstrate that constitutive slow-cycling BM reduces T-ALL sensitivity to chemotherapy. Various cell-autonomous and noncell-autonomous mechanisms contribute to chemoresistance and relapse. Selection of chemoresistant clones, novel mutations, and promoter hypomethylation contribute to hT-ALL relapse.<sup>33</sup> The microenvironment, notably through MSC, also participates in chemoresistance.<sup>34</sup> Adipocytes from extramedullary white adipose tissue protect B-ALL from various chemotherapies such as vincristine, daunorubicin, nilotinib, or L-asparaginase.<sup>18-20</sup> Our study extends previous data to constitutive BM adipocytes. It is noteworthy that CD44, a cell-surface adhesion molecule involved in T-ALL chemoresistance,<sup>35</sup> was increased in adipocyte-rich BM-derived T-ALL.

**Figure 6. (continued)** are calculated according to nonparametric Friedman test (\* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$ ). (C) Cell-cycle analysis and (D) metabolism status (left) MTG; [right] TMRE labeling panels) of hT-ALL#1 leukemic cells recovered from the different tested sites. Data are from 3 mice. (E) Cumulative growth of hT-ALL#10 cells during cocultures with MS5 and MS5-derived adipocytes. (F) Histograms are mean values ( $\pm$  SEM) of hT-ALL (#1, #4, #5, #10, #12) cells cocultures during 7 days on MS5, hMSC, MS5-derived, and hMSC-derived adipocytes. All cocultures were performed in triplicate. (G) Apoptosis levels of hT-ALL during cocultures with MS5 (blue) or MS5-derived adipocytes (orange) in presence of 1 to 10 nM vincristine. Histograms provide vincristine-induced apoptosis (calculated as ratio of % Annexin V<sup>+</sup> cells with vincristine over the spontaneous apoptosis [ie, without vincristine]). Shown are results from 3 experiments performed with 2 hT-ALL samples tested in triplicate. Statistics in panel G are calculated according to nonparametric Mann-Whitney U test; \*\*\* $P < .001$ .



Indeed, both T-ALL cell-cycle blockage/quiescence and increased hCD44 expression may participate in T-ALL chemoresistance. Because the leukemic initiating capacity is maintained in tail-derived T-ALL cells, slow-cycling BM may therefore be a protective niche during cell-cycle targeting drug treatments, from which dormant relapse-mediated T-ALL cells emanate. In comparison with children, the increased BM adiposity found in adults, which is somehow mimicked by tail BM here, may participate in the poorer adult T-ALL outcome. Furthermore, chemotherapy increases BM adiposity.<sup>13</sup> It may be speculated that chemotherapy-induced adipocytes further decrease cell-cycle progression and allow remaining T-ALL cells to escape from subsequent chemotherapy.

In conclusion, this study unravels the key regulatory impact of constitutive slow-cycling BM on T-ALL growth and phenotype, which translates into an increased resistance to chemotherapy in this BM territory. Understanding the molecular basis of niche-related protection will help eradicate T-ALL cells and is essential to improving T-ALL therapy.

## Acknowledgments

Mouse work was facilitated by Christophe Joubert and Julien Tilliet from the Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire/CEA animal facility. The authors thank Julien Rucci for his technical help in experiments and Rima Haddad and Irina Naguibeva for critically reading the manuscript. Damien Roos-Weil and Olivier Bernard helped with genomic WES analyses.

This work was supported by INSERM, CEA, Université Paris Diderot, Université Paris Sud, Institut National du Cancer (INCA),

Cancéropôle d'Ile de France, Région Ile de France, Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC, équipe labellisée), and the Association Laurette Fugain and Fondation de France. X.C. and S.P. were fellows of INCA and LNCC.

## Authorship

Contribution: X.C. and J.C. designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the paper; N.P., B.C., and C.J. performed experiments and analyzed data; E.D., M.-L.A., S.P., and B.U. analyzed data and gave advices on the manuscript; J.L., P.B., A.P., T.L., A.B., J.L.-P., and F.B. provided patient samples and clinical data; and F.P. coordinated and directed the study and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

The current affiliation for X.C. is Institut de Duve, Brussels, Belgium.

ORCID profiles: B.U., 0000-0001-6323-5737; F.P., 0000-0001-8995-596X.

Correspondence: Françoise Pflumio, Laboratoire des cellules Souches Hématopoïétiques et Leucémiques, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer, IRCM, CEA, 18 route du panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France; e-mail: francoise.pflumio@cea.fr; or Xavier Cahu, Laboratoire des cellules Souches Hématopoïétiques et Leucémiques, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer, IRCM, CEA, 18 route du panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France; e-mail: cahu\_xavier@yahoo.fr.

## References

1. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3398-3406.
2. Passaro D, Irigoyen M, Catherinet C, et al. CXCR4 is required for leukemia-initiating cell activity in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2015;27(6):769-779.
3. Pitt LA, Tikhonova AN, Hu H, et al. CXCL12-producing vascular endothelial niches control acute T cell leukemia maintenance. *Cancer Cell*. 2015;27(6):755-768.
4. Silva A, Laranjeira AB, Martins LR, et al. IL-7 contributes to the progression of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Cancer Res*. 2011;71(14):4780-4789.
5. Uzan B, Poglio S, Gerby B, et al. Interleukin-18 produced by bone marrow-derived stromal cells supports T-cell acute leukaemia progression. *EMBO Mol Med*. 2014;6(6):821-834.
6. Armstrong F, Brunet de la Grange P, Gerby B, et al. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood*. 2009;113(8):1730-1740.
7. Winter SS, Sweatman JJ, Lawrence MB, Rhoades TH, Hart AL, Larson RS. Enhanced T-lineage acute lymphoblastic leukaemia cell survival on bone marrow stroma requires involvement of LFA-1 and ICAM-1. *Br J Haematol*. 2001;115(4):862-871.
8. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20-44.
9. Tavassoli M, Crosby WH. Bone marrow histogenesis: a comparison of fatty and red marrow. *Science*. 1970;169(3942):291-293.
10. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259-263.
11. Cawthorn WP, Scheller EL, Learman BS, et al. Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. *Cell Metab*. 2014;20(2):368-375.
12. Scheller EL, Rosen CJ. What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1311:14-30.
13. Sheng X, Mittelman SD. The role of adipose tissue and obesity in causing treatment resistance of acute lymphoblastic leukemia. *Front Pediatr*. 2014;2:53.
14. Scheller EL, Doucette CR, Learman BS, et al. Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nat Commun*. 2015;6:7808.

15. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. 2011; 17(11):1498-1503.
16. Manabe Y, Toda S, Miyazaki K, Sugihara H. Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. *J Pathol*. 2003;201(2):221-228.
17. Herroon MK, Rajagurubandara E, Hardaway AL, et al. Bone marrow adipocytes promote tumor growth in bone via FABP4-dependent mechanisms. *Oncotarget*. 2013;4(11):2108-2123.
18. Pramanik R, Sheng X, Ichihara B, Heisterkamp N, Mittelman SD. Adipose tissue attracts and protects acute lymphoblastic leukemia cells from chemotherapy. *Leuk Res*. 2013;37(5):503-509.
19. Behan JW, Yun JP, Proektor MP, et al. Adipocytes impair leukemia treatment in mice. *Cancer Res*. 2009;69(19):7867-7874.
20. Ehsanipour EA, Sheng X, Behan JW, et al. Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer Res*. 2013; 73(10):2998-3006.
21. Liu Z, Xu J, He J, et al. Mature adipocytes in bone marrow protect myeloma cells against chemotherapy through autophagy activation. *Oncotarget*. 2015; 6(33):34329-34341.
22. Gachet S, Genescà E, Passaro D, et al. Leukemia-initiating cell activity requires calcineurin in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2013; 27(12):2289-2300.
23. Poglio S, Cahu X, Uzan B, et al. Rapid childhood T-ALL growth in xenograft models correlates with mature phenotype and NF- $\kappa$ B pathway activation but not with poor prognosis. *Leukemia*. 2015;29(4):977-980.
24. Jöhner K, Ploner C, Thangavadivel S, Wuggenig P, Greil R. Adipocyte-derived players in hematologic tumors: useful novel targets? *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(1):61-77.
25. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016;529(7586):298-306.
26. Miething C, Scuoppo C, Bosbach B, et al. PTEN action in leukaemia dictated by the tissue microenvironment. *Nature*. 2014;510(7505):402-406.
27. Clappier E, Gerby B, Sigaux F, et al. Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J Exp Med*. 2011;208(4):653-661.
28. Poglio S, Lewandowski D, Calvo J, et al. Speed of leukemia development and genetic diversity in xenograft models of T cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(27):41599-41611.
29. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2002;1(1):75-87.
30. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013;501(7467):328-337.
31. Gerby B, Clappier E, Armstrong F, et al. Expression of CD34 and CD7 on human T-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations. *Leukemia*. 2011;25(8):1249-1258.
32. Chiu PP, Jiang H, Dick JE. Leukemia-initiating cells in human T-lymphoblastic leukemia exhibit glucocorticoid resistance. *Blood*. 2010;116(24): 5268-5279.
33. Kunz JB, Rausch T, Bandapalli OR, et al. Pediatric T-cell lymphoblastic leukemia evolves into relapse by clonal selection, acquisition of mutations and promoter hypomethylation. *Haematologica*. 2015;100(11):1442-1450.
34. Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest*. 2007;117(4):1049-1057.
35. Hoofd C, Wang X, Lam S, et al. CD44 promotes chemoresistance in T-ALL by increased drug efflux. *Exp Hematol*. 2016;44(3):166-171.



## Supplemental methods

### MS5-derived adipocytes and MSC-derived adipocytes

Confluent MS5 cells were grown during 4 days in an induction medium containing  $\alpha$ -MEM (Life technologies®, Carlsbad, CA, USA) and 10% FBS with 3-Isobutyl-1-methylxanthine (0.1mM, Sigma-Aldrich®), bovine insulin (1 $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich®) and indomethacin (0.1mM, Sigma-Aldrich®) followed by a PBS wash and a 5-day maintenance period in  $\alpha$ -MEM (Life technologies®) + 10% FBS with bovine insulin (1 $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich®). MS5-derived adipocytes were stained using Oil Red O staining to visualize adipocyte differentiation and triglyceride content was evaluated using an enzymatic-based colorimetric assay as described above. Human MSC were obtained from BM of healthy donors after informed consent (department of Cell Therapy, Hôpital Saint Louis, Paris, France). Human adipocytes were obtained after a 3-week differentiation period of MSC with the StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (Life technologies®).

### Flow cytometry

The leukemic phenotype in thoracic or tail vertebrae BM was determined among hCD45<sup>+</sup> cells using fluorescein (FITC-), phycoerythrin (PE-), PE-cyanin 7 (PC7-) and allophycocyanin (APC-) mouse anti-human monoclonal antibodies specific for CD7, CD4, CD8, sCD3, TCR $\alpha\beta$ , CD49d, CD31 (eBioscience, San Diego, CA, USA), or CXCR4, CD34, CD44, CD127 (IL7-R $\alpha$ ) (Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland). The leukemic ICN1 phenotype was evaluated in mCD45.2<sup>+</sup>CD45.1<sup>-</sup> cells using murine CD4, CD8, surface CD3, TCR $\beta$ , V- $\alpha$ 2-TCR and CD127 (IL7-R) (eBioscience). Cell cycle analysis of leukemic cells from thoracic or tail vertebrae was performed in hCD45<sup>+</sup>/hCD7<sup>+</sup> cells or mCD45.2<sup>+</sup> ICN1 cells after fixation and permeabilization (BD Cytotfix/cytoperm™) using Hoechst 33342 according to manufacturer's instructions (BD Bioscience) and Ki67 (BD Biosciences). After leukemic cells permeabilization, intracellular protein were stained with anti-human antibodies specific for Bax (eBioscience), Bcl2, Mcl1, P21 (Cell Signaling) and E2F1 (Abcam). During analysis, doublet exclusion was performed. To study leukemic apoptosis in thoracic or tail vertebrae, cells were washed in apoptosis buffer (BD Bioscience) and stained during 15 minutes at room temperature using hCD7-PC7, hCD45-APC and Annexin V-FITC (BD Bioscience). Hoechst 33342 (Life Technologies®) was added prior to flow cytometry analysis to detect dead cells. Flow cytometry was performed on FACS Calibur, LSRII or Canto cytometers (BD Biosciences) and plots were analysed using the FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

### Comparative Genomic Hybridization (CGH) arrays and NOTCH1 mutations

Genomic DNA of Thorax- and Tail-derived hT-ALL cells was isolated and deposited in CytoScan®HD (Affymetrix®, Santa Clara, CA, USA) after sample preparation according to manufacturer's instructions. CGH arrays were interpreted using the Chromosome analysis Suite (Affymetrix®) using a 50kb or a 10kb resolution. *NOTCH1* and *FBXW7* mutations were investigated using sequencing of PCR amplifications of exons 26-28, 34 of *NOTCH1* and exons 9-10 of *FBXW7* (list of primers provided in supplementary table 2).

### Expression profiling on Affymetrix microarray

Total RNA from Thorax- or Tail-derived hT-ALL was purified using the RNAqueous Micro Kit (ambion, life technologies, USA). Labeling and hybridization to the Affymetrix Human Gene 1.0 ST gene expression microarrays were performed following standard Affymetrix procedures (<http://www.affymetrix.com>). The microarray raw data are deposited into GEO (accession number GSE100718).

### **Gene set enrichment analysis**

Analysis was performed using gene sets of hallmark from GSEA MSigDB Collections C2analysis (Molecular Signatures Database v3.0; <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) comparing micro-array data from Thorax- and Tail-derived hT-ALL.

### **Measurement of Cell respiration and glycolysis**

To obtain a homogeneous monolayer of cells,  $1.2 \times 10^5$  cells per well were plated in XFp cell culture microplates (XFp FluxPak, Ref: 103022-100, Seahorse Bioscience) pre-coated with 22.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Cell-Tak (ref: 354240, Corning®). OCR was measured in cells incubated in Seahorse XF base medium (ref: 102353-100 Seahorse Bioscience) supplemented with 2 mM glutamine (ThermoFisher Scientific) at 37 °C in a CO<sub>2</sub>-free incubator for 1h equilibration before the measurement was done. An overnight-equilibrated calibration cartridge (Seahorse Bioscience) was loaded with 5.55 mM Glucose (port A), 1  $\mu\text{M}$  oligomycin (port B) and 50 mM 2-DG (port C) all obtained from Seahorse XFp Glycolysis Stress test kit. ECAR was measured in cells incubated in Seahorse XF media supplemented with 5.55 mM Glucose (Sigma-Aldrich®), 2 mM Glutamine and 1 mM Pyruvate (ThermoFisher Scientific) at 37 °C in a CO<sub>2</sub>-free incubator for 1h equilibration before the measurement was done. An overnight-equilibrated calibration cartridge (Seahorse Bioscience) was loaded with 1  $\mu\text{M}$  oligomycin (port A), 2  $\mu\text{M}$  FCCP (port B) and 0.5  $\mu\text{M}$  Rotenone/antimycin (port C) all obtained from Seahorse XFp Cell Mito Stress test kit. In all experiments, the protein concentration was determined in each well at the end of the measurements, using the Qubit® Protein assay kit (ref: Q33211, ThermoFisher Scientific) after cell lysis in RIPA buffer (Sigma–Aldrich®).

### **Measurement of Glucose 6 Phosphate Deshydrogenase activity**

Thorax- and Tail-derived cells were purified then lysed in water (500  $\mu\text{L}$ /  $3.10^6$  cells). G6PD activity was analysed by using G6PD assay kit (ab176722, Abcam)

### **Isolation of Gonadal Adipose Tissue-Derived Cells**

Gonadal Adipose Tissue (GAT) was subjected to mechanical dissociation. Visible blood vessels, and ganglia were carefully dissected and removed. GAT fragments were digested at 37°C in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.2% bovine serum albumin (BSA) and 2 mg/ml collagenase B (Roche Diagnostics, Meylan, France) for 30 minutes. After elimination of undigested fragments by filtration through 70- $\mu\text{m}$  filters, cells were submitted to centrifugation (320 G, 10 minutes). Cells obtained were resuspended in PBS then, used for flow cytometry analysis.

### **Statistical analysis**

Graphics were designed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA). Continuous variables were compared using the t-test or the Mann-Whitney test. When comparing thoracic and tail-derived cells from the same mouse, the paired t-test or the paired Mann-Whitney tests were used. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* correspond to a p-value <0.05, 0.01,  $10^{-3}$  or  $10^{-4}$ , respectively. Statistics were performed using R Package (R Development Core Team (2006). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>). The leukemic initiating capacity in limiting dilution assays was evaluated using L-Calc™ software (Stem Cell™ Technologies, Canada).

**Supplementary table 1: patients' characteristics**

	Age	Gender	White blood cell count (G/L)	CNS involvement	Karyotype	Genomic abnormalities	EGIL classification
hT-ALL #1	6	F	743	Yes	t(11;14)(11p13;q11)	<i>SIL-TAL1</i> deletion <i>NOTCH1</i> mutated	mature
hT-ALL #2	8	M	48	No	Normal	<i>NOTCH1</i> mutated	cortical
hT-ALL #3	16	M	362	No	t(11;14)(p13;q11)	<i>NOTCH1</i> mutated	cortical
hT-ALL #4	13	F	7	No	NA	<i>NOTCH1</i> mutated	cortical
hT-ALL #5	1	M	707	Yes	t(6;7) (q23;q34)	<i>MYB</i> <i>NOTCH1</i> mutated	cortical
hT-ALL #6	2	M	230	No	del(6)(q22q26)	NA	Pre-T
hT-ALL #10	12	F	239	No	del (6) (q14;q24)	<i>NOTCH1</i> mutated	pre-T
hT-ALL #11	12	M	27	No	der(6)t(1;6)(p3?5;q2?7)	<i>FBXW7</i> mutated <i>TLX3</i>	cortical
hT-ALL #12	10	F	440	No	45, X, -X[25]/46, XX [5]	<i>SIL-TAL1</i> deletion	Pre-T
hT-ALL #14	15	M	NA	NA	NA	NA	pre-T



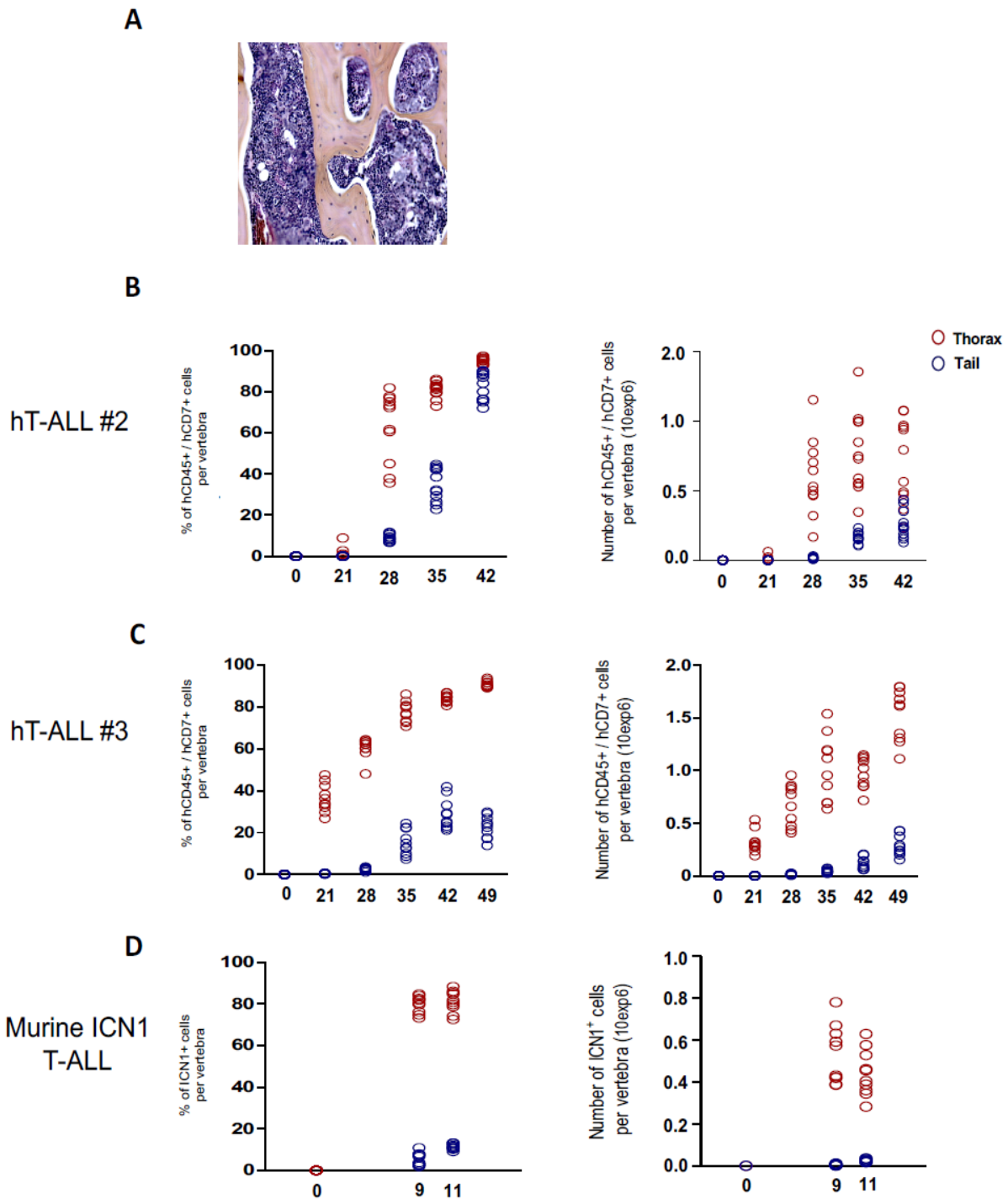
**Supplementary table 2: *NOTCH1* and *FBXW7* primers**

	<b>Primers</b>
<b><i>NOTCH1</i></b>	<p><i>Exon 26: NOTCH1_X26_F1: AGTGGGCTGGAGGCACC</i>  <i>NOTCH1_X26_R1: CCCAGGAGAGTTGCGGG</i></p> <p><i>Exon 27: NOTCH1_X27_F1: TGCCTGCGGCAGCATC</i>  <i>NOTCH1_X27_R1: ACTGGCACAAACAGCCAGC</i></p> <p><i>Exon 28: NOTCH1_X28_F1: CTGATGTCCGGGCACCTG</i>  <i>NOTCH1_X28_R1: GTGAGGATGCTCGGCCAG</i></p> <p><i>Exon 34: NOTCH1_X34_F11: CATCGGGCACCTGAACGT</i>  <i>NOTCH1_X34_R11: GAACTGGGCTGCGGTCAC</i>  <i>NOTCH1_X34_F21: CAGTAGCCTTGCTGCCAGC</i>  <i>NOTCH1_X34_R21: CCTGGCATCCACAGAGCG</i></p>
<b><i>FBXW7</i></b>	<p><i>Exon 9: FBXW7_X09_F1: CCTTTCTACCCAAAAGTAATCATCTTAAG</i>  <i>FBXW7_X09_R1: AGAGGAAGAAGTCCCAACCATG</i></p> <p><i>Exon 10: FBXW7_X10_F2: AACCTTGACTAAATCTACCATGTT</i>  <i>FBXW7_X10_R2: CTGGATCAGCAATTTGACAGTG</i></p>

### Supplementary table 3: CGH arrays of hT-ALL cells in Thoracic or Tail BM

	Thorax	Tail
hT-ALL #2*	Chromosome 9, p21.3 Homozygous deletion of CDKN2A and MTAP loci	Chromosome 9, p21.3 Homozygous deletion of CDKN2A and MTAP loci
hT-ALL #4*	Chromosome 9, p21.3 Homozygous deletion of the CDKN2A and CDKN2B locus	Chromosome 9, p21.3 Homozygous deletion of the CDKN2A and CDKN2B locus

\* 2 mice per hT-ALL sample.

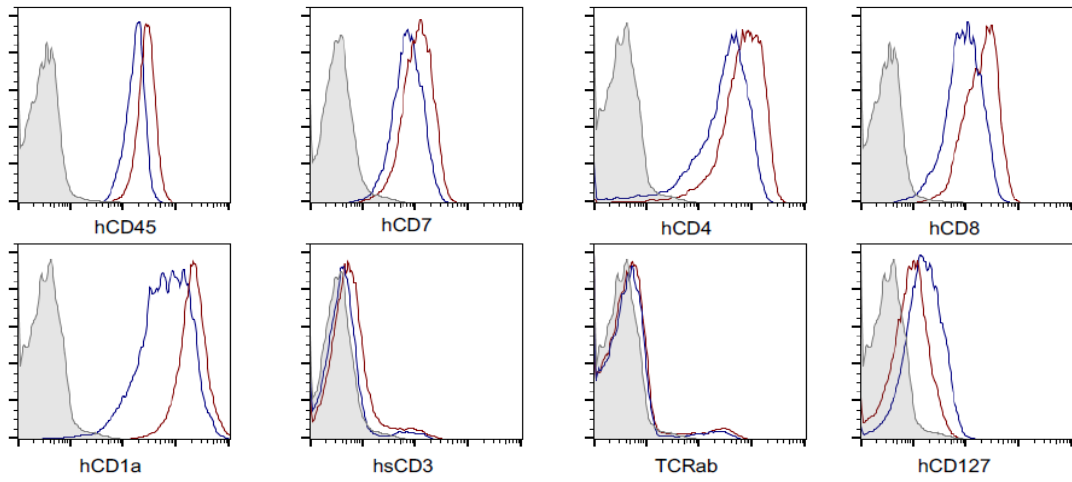


**Supplementary figure 1: Engraftment kinetics for hT-ALL #2, hT-ALL #3 in NSG mice and ICN1-murine T-ALL cells in C57BL/6 mice.**

**A.** Shown is the femur section from a non-manipulated NSG mouse colored with May-Grunwald Giemsa staining. NSG mice were thereafter injected with  $10^6$  diagnostic hT-ALL #2 (**B**), hT-ALL #3 (**C**) cells per mice.  $10^5$  murine CD45.2<sup>+</sup> ICN1 T-ALL cells were injected in CD45.1 C57BL/6 mice (**D**). At each time point, two mice were sacrificed until mice showed clinical signs of illness. 3 to 6 Thoracic or Tail vertebrae were isolated per mouse. The % of hCD45<sup>+</sup>/hCD7<sup>+</sup> cells or CD45.2 ICN1 cells per vertebra was determined in Ter119<sup>+</sup> mononuclear cells (**B-D**, left graphs). Diagrams indicate mean numbers or % (+/- S.E.M.).

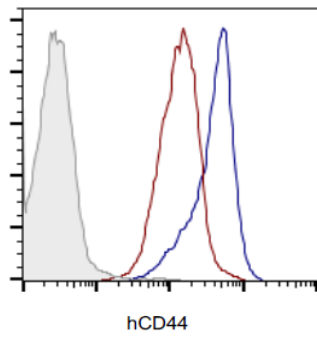
**A**

hT-ALL #2

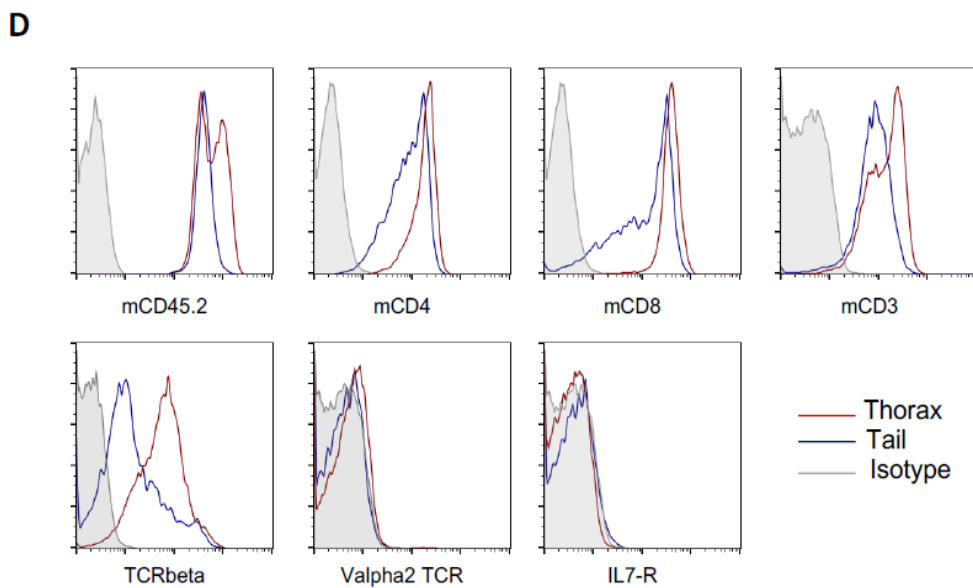
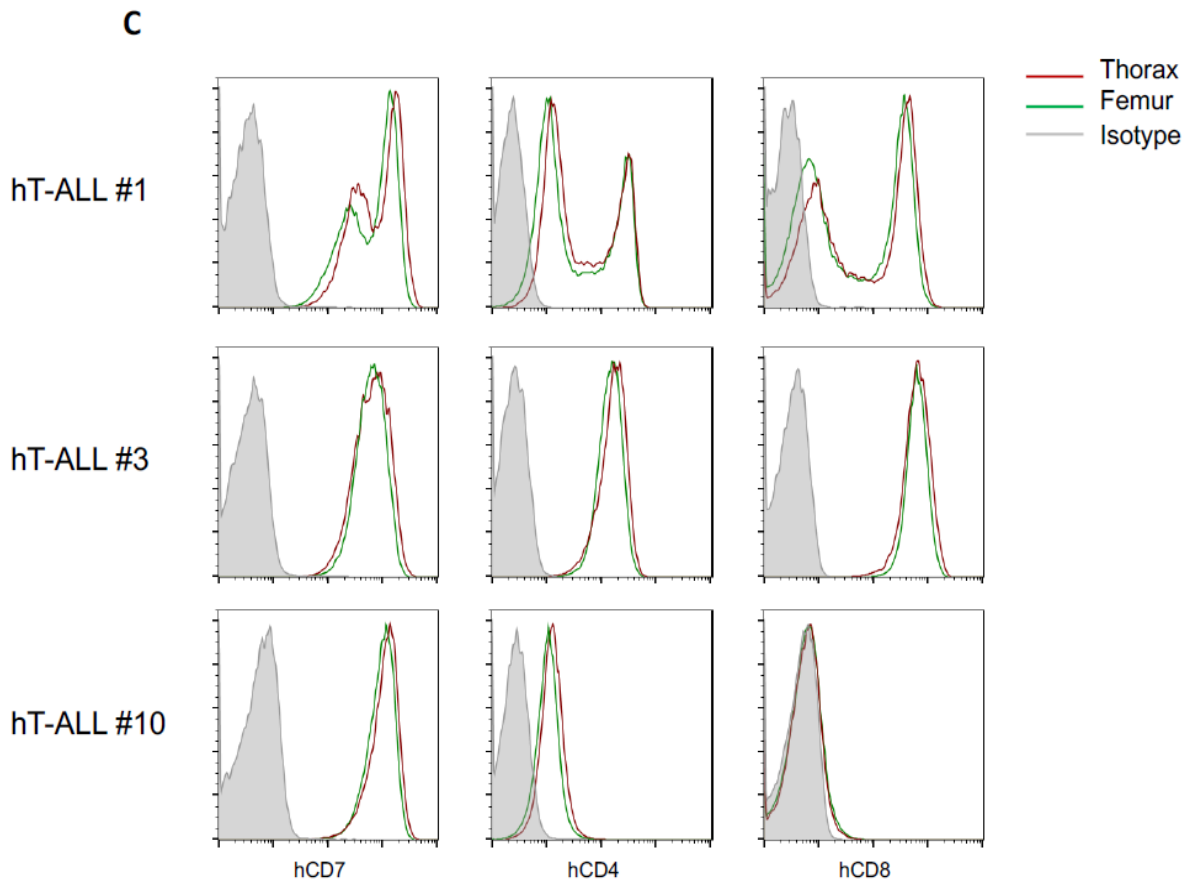


**B**

hT-ALL #1

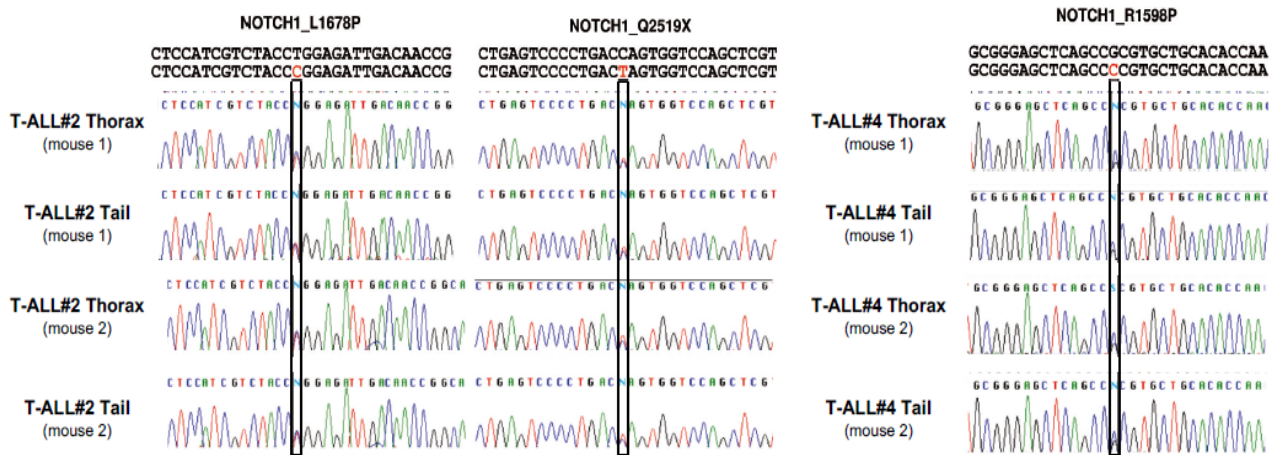


**Supplementary figure 2: hT-ALL cell surface phenotype in thoracic or tail vertebrae BM.**



**Supplementary figure 2: hT-ALL cell surface phenotype in thoracic or tail vertebrae BM.**

**A.** hT-ALL #2 cell surface phenotype (representative of #3, #4 and #5). Thoracic and tail histograms are in red and black, respectively (representative of 3 mice per hT-ALL). **B.** Cell surface expression of CD44 among thoracic or tail hT-ALL cells. Shown is hT-ALL #1. **C.** Cell surface phenotype of hT-ALL in thoracic vertebrae BM (red) and Femur (green). Isotype controls are colored in dashed yellow line. Representative of 3 mice per hT-ALL. **D.** Cell surface markers detected in ICN1 mouse T-ALL recovered from thoracic or tail vertebrae. Representative of 3 mice.



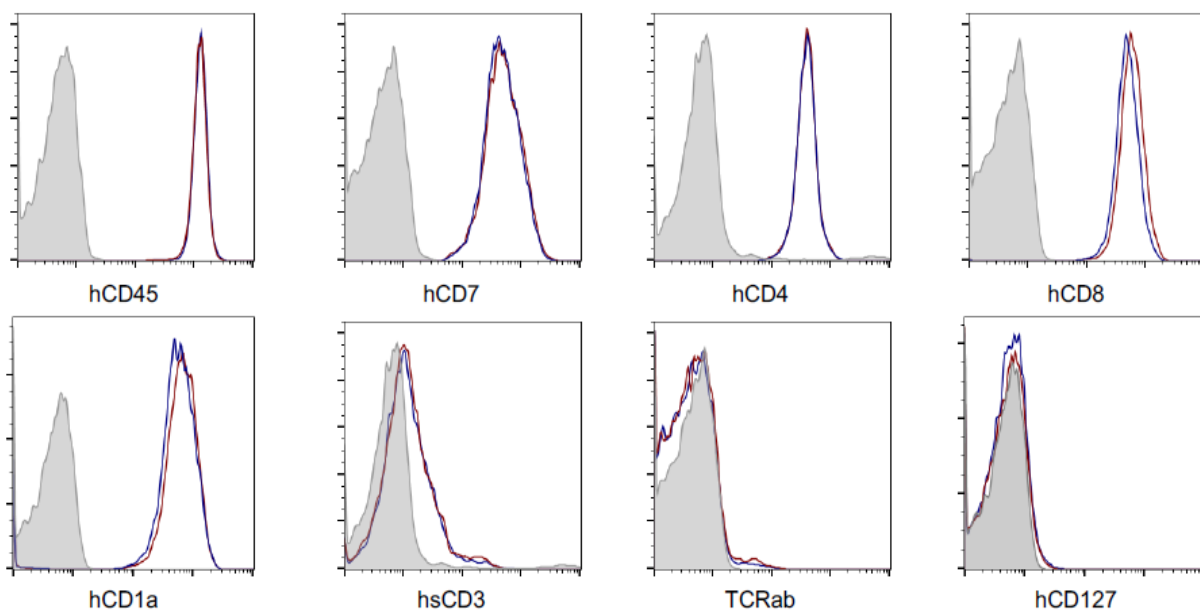
**Supplementary figure 3: *NOTCH1* mutations in thoracic or tail BM hT-ALL #2 and #4.**

Genomic DNA from Thorax- or Tail-derived hT-ALL cells was isolated and a polymerase chain reaction was performed using specific primers (list provided in supplementary table 2) and Sanger sequencing was performed. The results show that sequences are identical between Thorax- and Tail-derived hT-ALL.

**A**

hT-ALL #2

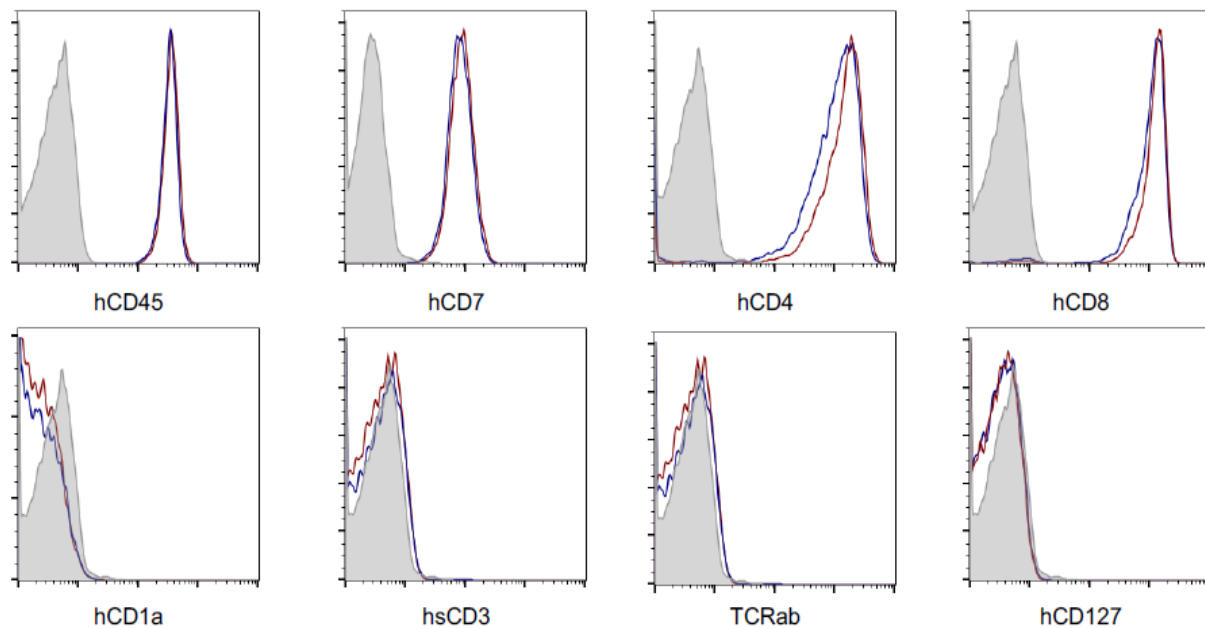
— Thorax  
— Tail  
— Isotype



**B**

hT-ALL #3

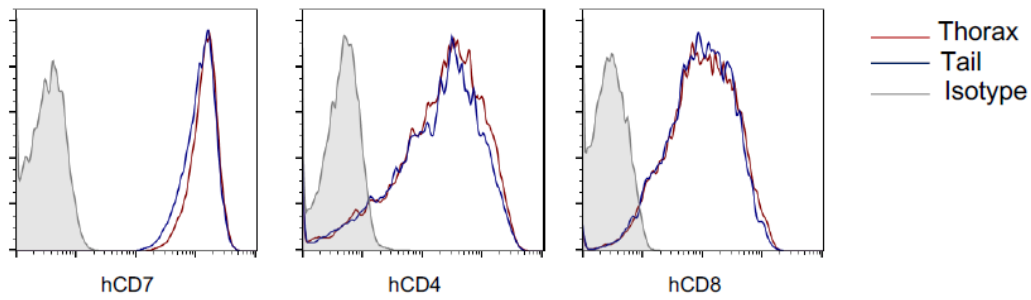
— Thorax  
— Tail  
— Isotype



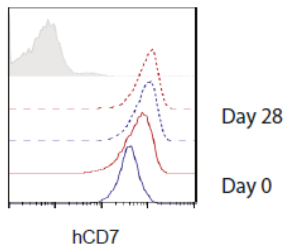


C

hT-ALL #1

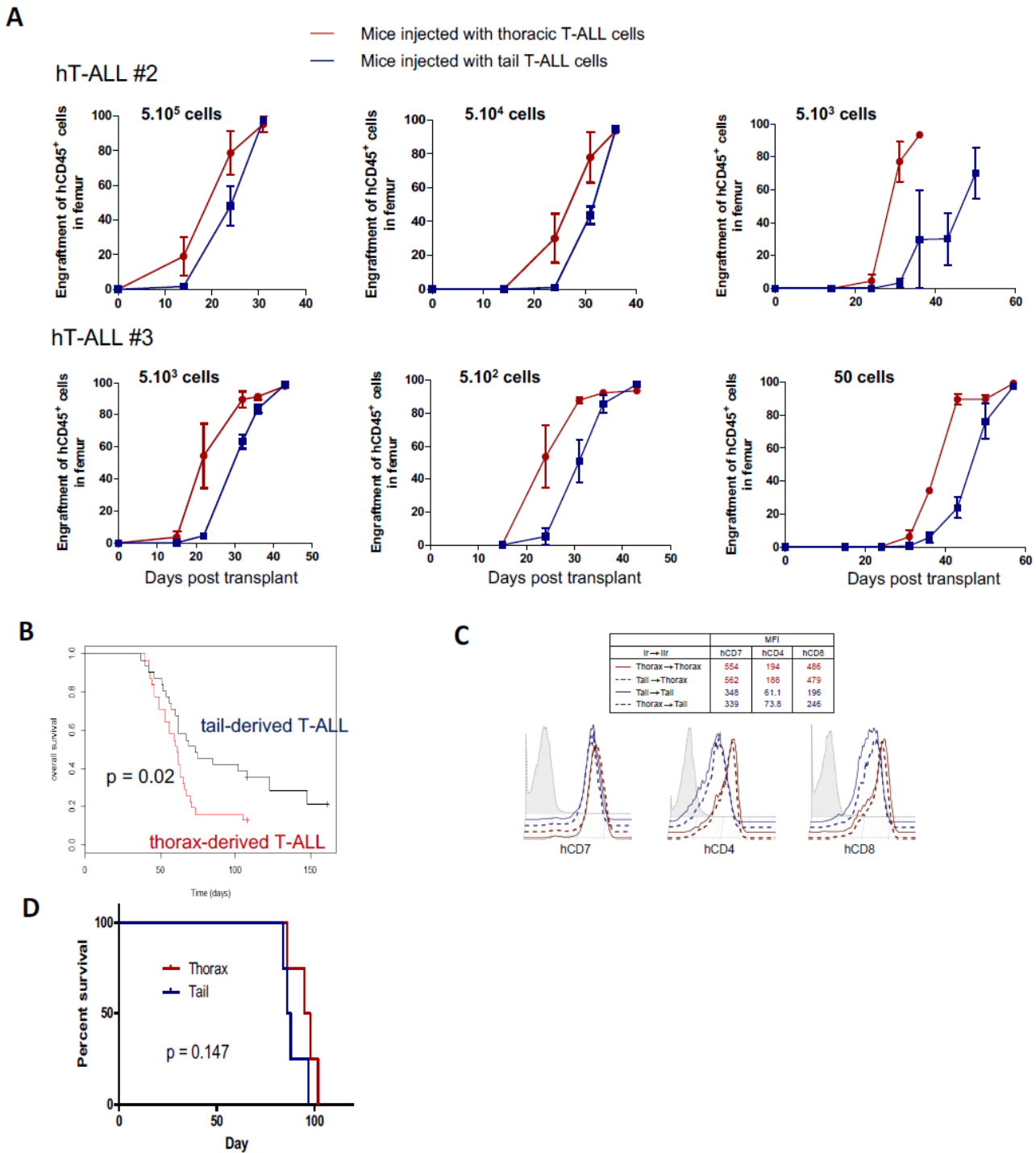


D



**Supplementary figure 4: Cell surface phenotype of Thorax- and Tail-derived hT-ALL #2 and hT-ALL #3 after long-term coculture with MS5-DL1.**

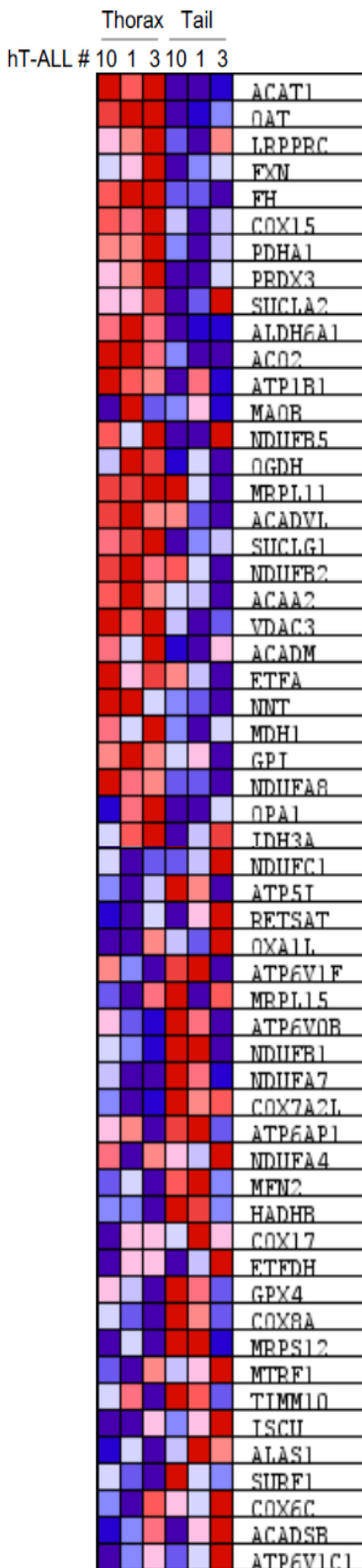
Cell surface phenotype of Thorax- or Tail-derived hT-ALL #2 (A) or hT-ALL #3 (B) after long-term coculture (28 days) of Thorax- or Tail-derived hT-ALL cells with MS5-DL1 stromal cells. Thoracic or tail histograms are in red and blue, respectively. Isotypes are colored in dashed yellow line. Each condition was performed in triplicate. **C-D**. Cell surface phenotype in Thorax- or Tail-derived BM after 12 (C) and 28 (D, dashed histograms) days of hT-ALL #1 in co-culture with MS5-DL1 stromal cells (performed in quadruplicate).



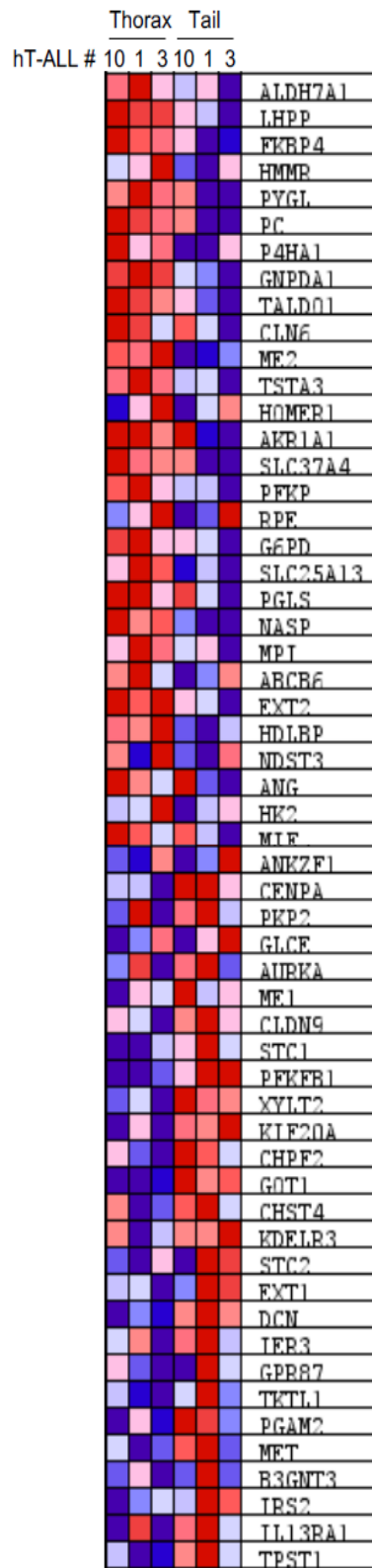
**Supplementary figure 5: Secondary transplant of Thorax- or Tail-derived hT-ALL cells.**

**A-C.** hT-ALL were isolated and purified from thoracic or tail vertebrae BM and injected intravenously into secondary NSG mice. **A.** Engraftment was monitored after sampling BM cells from Femurs. 3 mice per niche (thoracic or tail) were injected. Mean data (+/- S.E.M.) are indicated. **B.** Overall survival in secondary NSG mice (31 mice in each group; 62 mice in total). The p-value corresponds to the Log-rank test. **C.** Human CD7, CD4 and CD8 surface expression in a representative mouse after secondary transplant of Thorax- or Tail-derived hT-ALL. **D.** Thorax- and Tail-derived hT-ALL #1 cells were grown in co-culture with MS5-DL1 cells during 12 days before transplantation into secondary mice (500 cells/mouse, 3 mice/niche). Survival of mice is indicated. Representative of two experiments. Mean data (+/- S.E.M.) are indicated.

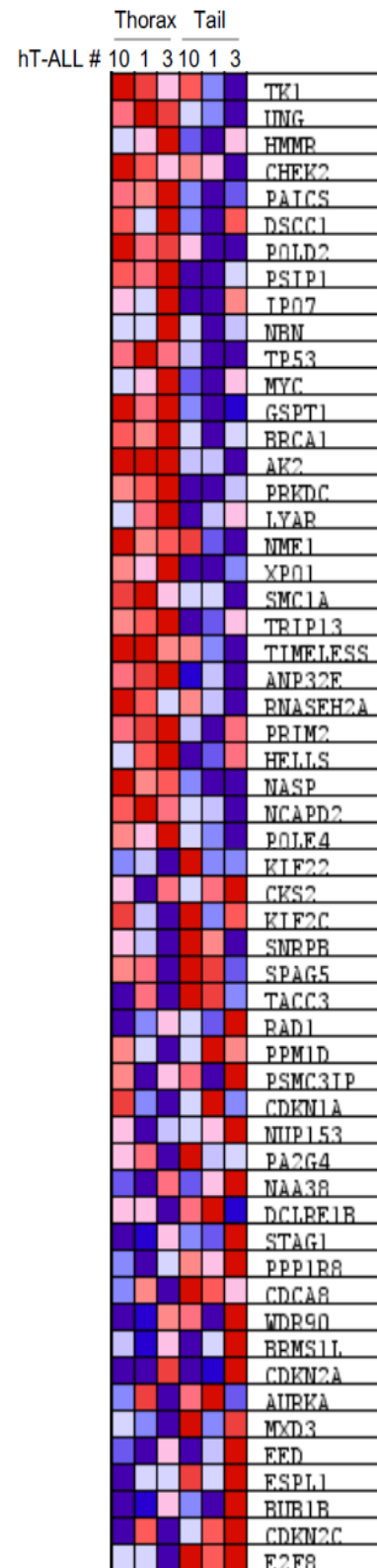
### A. Oxidative Phosphorylation



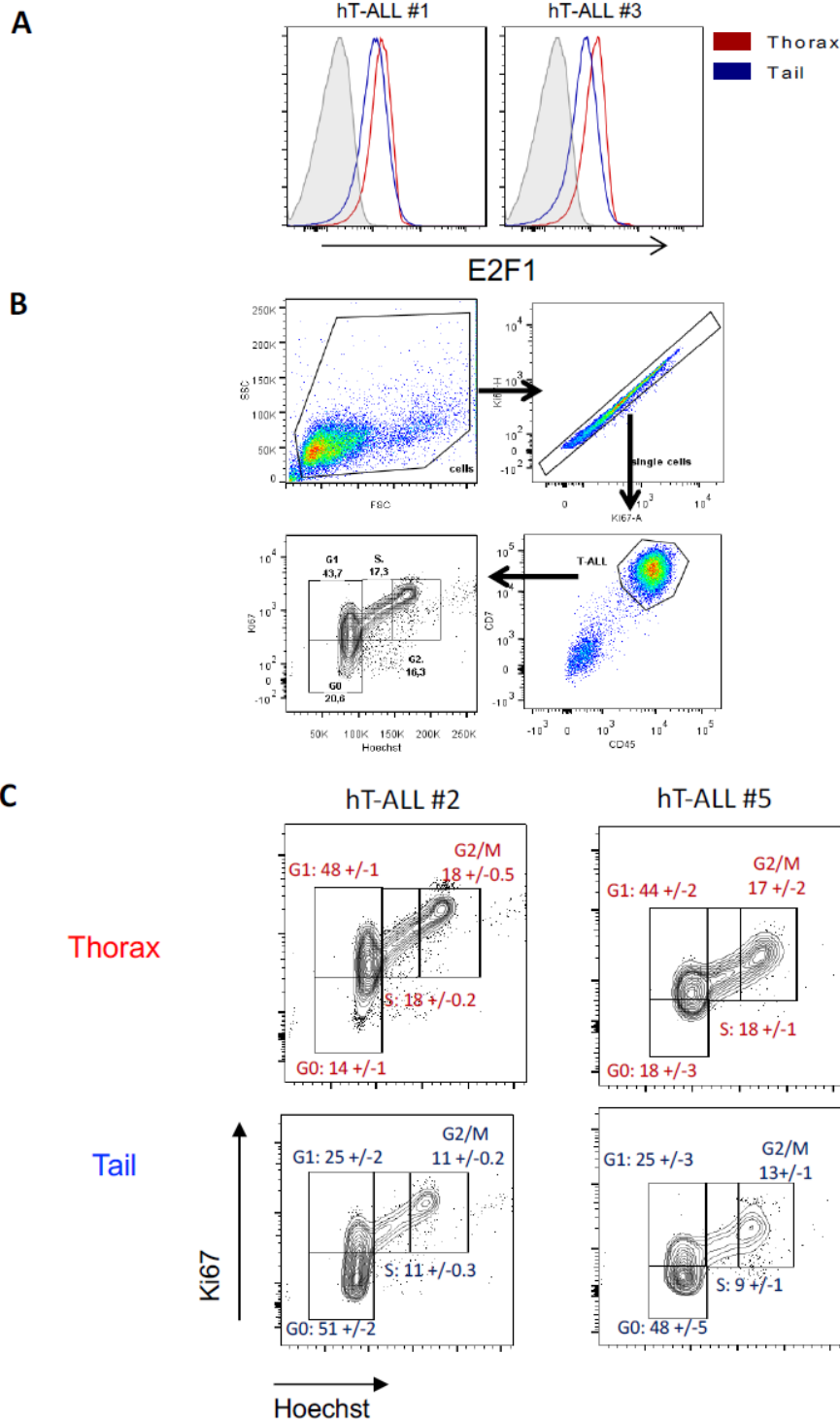
### B. Glycolysis signature



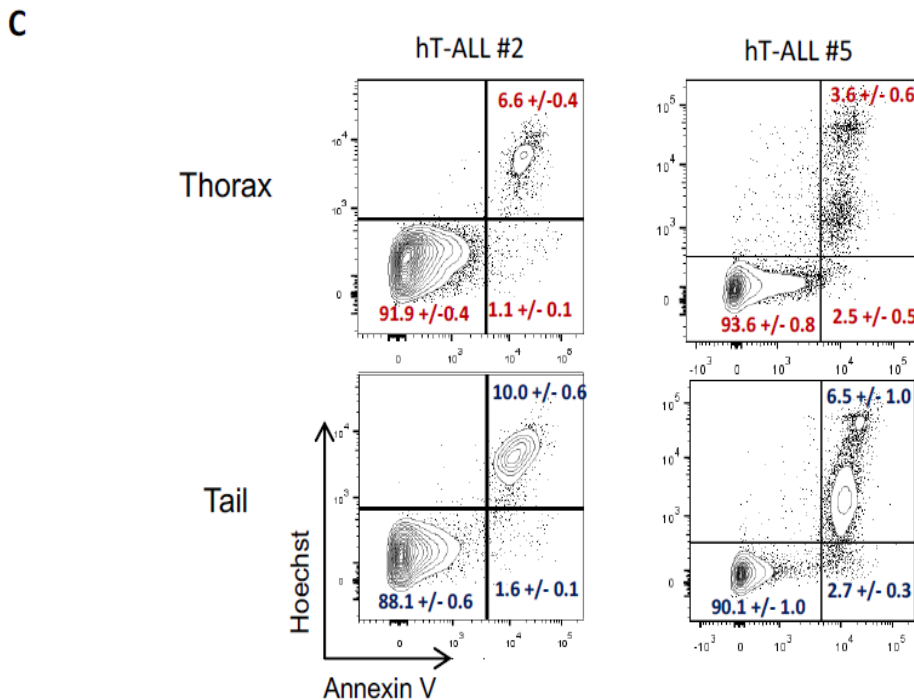
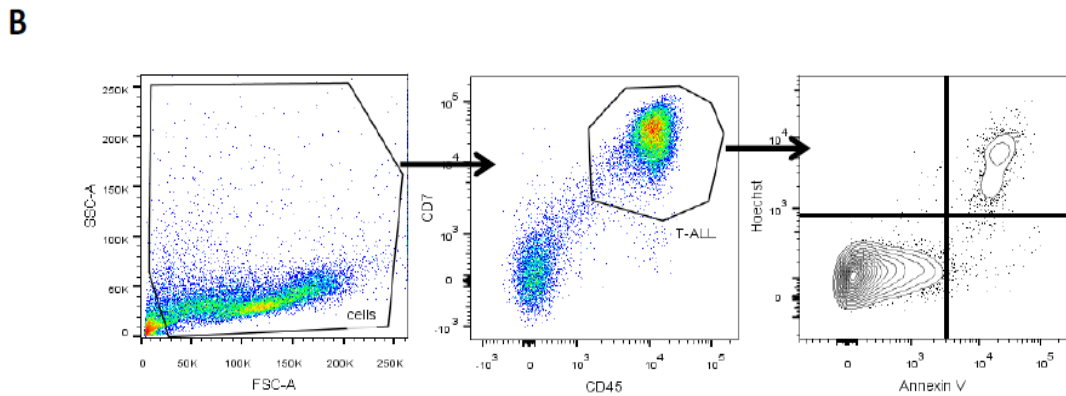
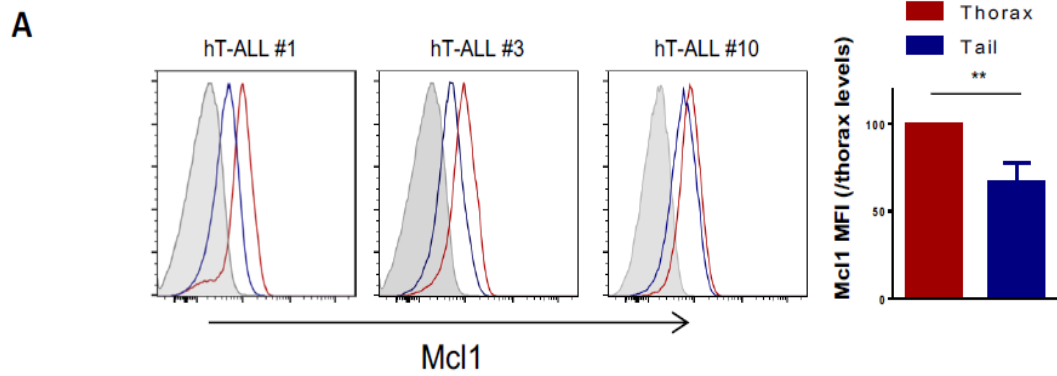
### C. E2F\_Targets



**Supplementary figure 6: List of genes inversely expressed in Thorax- and Tail-derived hT-ALL.** Data from 3 hT-ALL (#1, #3, #10) recovered from NSG mouse BM sites. Shown are comparative levels of 56 (29(+)) and 27(-) genes.

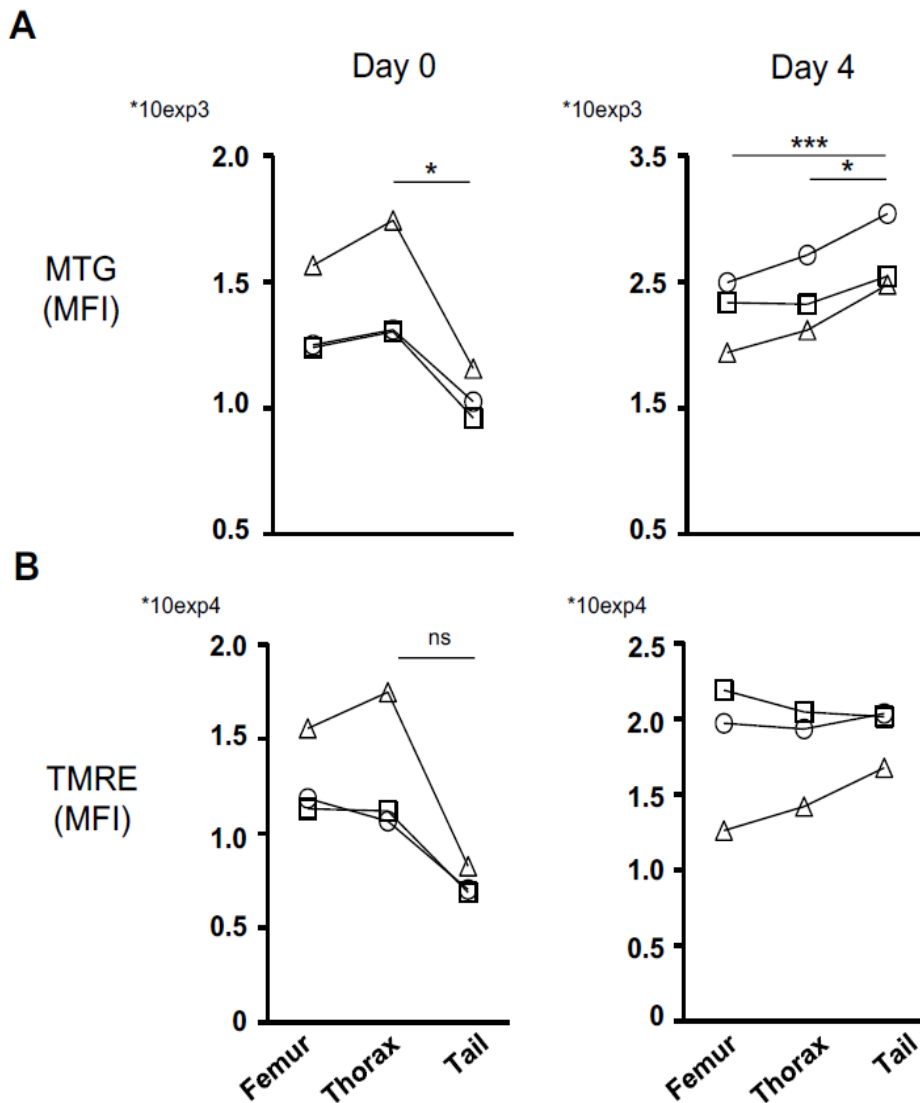


**Supplementary figure 7: hT-ALL cell cycle analysis in thoracic and tail bone marrow vertebrae.** NSG mice injected with hT-ALL #2 and #5 were sacrificed at late time points - determined by iterative bone marrow samplings showing leukemic infiltration > 90% - to ensure that hT-ALL cells had engrafted into Tail vertebrae. Cells were fixed, permeabilized and further stained with anti-E2F1 antibody, or anti-Ki67 antibody and Hoechst. **A.** Levels of E2F1 in hT-ALL from thoracic (red) and from tail (blue) vertebrae. Of note P21 was equally expressed in hT-ALL from both sites. Unstained controls are shown as shadowed histograms. **B.** Gating strategy for the cell cycle measurement. **C.** Cell cycle plots for hT-ALL #2 and #5. These results are representative of 6 T-ALL samples (136 vertebrae from 20 mice).



**Supplementary figure 8: hT-ALL apoptosis in thoracic and tail vertebrae BM.**

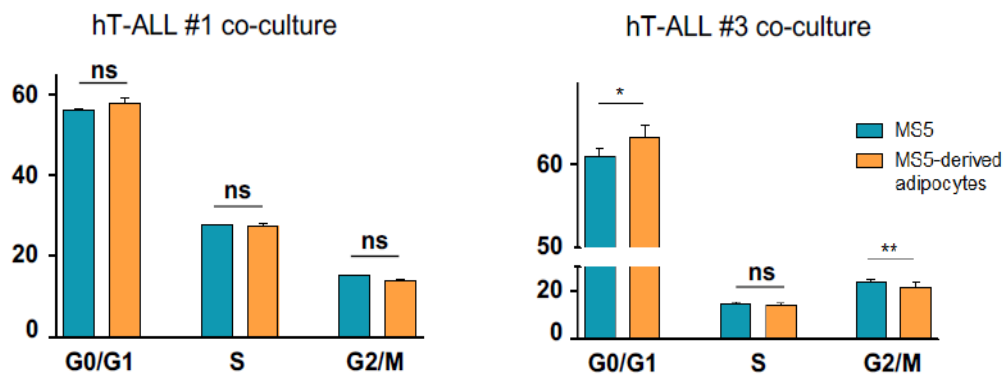
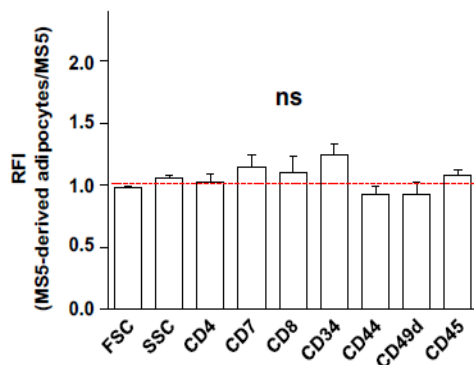
**A.** MCL1 expression in hT-ALL from thoracic (red) and from tail (blue) vertebrae. Of note BCL2 and Bax expression were similar in hT-ALL from both sites. Unstained controls are shown as shadowed histograms. **B.** Gating strategy. **C.** Apoptosis plots for hT-ALL #2 and #5. Representative of a total of 5 studied hT-ALL samples (>100 vertebrae from a total of 16 analysed mice).



**Supplementary figure 9: Rescue of the mitochondrial mass and membrane potential during *ex vivo* permissive cultures.**

NSG mice (n=3) injected with hT-ALL #1 were sacrificed at late time points - determined by iterative bone marrow samplings showing leukemic infiltration > 90% - to ensure that hT-ALL cells had engrafted into tail vertebrae. Cells were fixed, permeabilized and further stained with **A.** MTG and **B.** TMRE. Flow cytometry analyses show that Tail-derived hT-ALL exhibit a decreased MTG and TMRE labelling, indicative of mitochondrial loss compared to Femur or Thorax-derived hT-ALL, after being isolated from their BM niche (day 0). These features were lost after 4 days in co-cultures with MS5-DL1 stromal cells. Statistics are calculated according to non-parametric Friedman test (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).



**A****B**

### Supplementary figure 10: Adipocytes influence hT-ALL characteristics

**A.** Cell cycle of hT-ALL 6 days (#1; 3) co-cultures with MS5 and MS5-derived adipocytes. **B.** Cell surface expression of a panel of antigens. The results are Ratio of Fluorescent Intensities (RFI) calculated by dividing the MFI of every marker on cells recovered from co-cultures with MS5-derived adipocytes over the co-cultures with MS5 cells. The results are Mean  $\pm$  S.E.M. from 3 hT-ALL tested in triplicate during 7 days co-cultures.

## ARTICLE 2

---

Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont des hémopathies des progéniteurs lymphocytaires T que l'on pense être générées dans le thymus. Ce dogme, largement appuyé par les modèle murins, est très récemment repensé par un article montrant l'acquisition possible des premiers évènements oncogéniques dans les cellules progénitrices hématopoïétiques de la moelle osseuse (MO). Quelque soit l'origine cellulaire/tissulaire de cette pathologie, les cellules leucémiques rencontrent de nombreux micro-environnement dont celui de la MO qu'elles colonisent rapidement lors de la propagation de la pathologie.

L'intérêt porté aux interaction des cellules leucémiques de LAL-T avec le micro-environnement médullaire de plus en plus important. Bien que les intervenant cellulaires de la MO sont largement définis dans la littérature, la niche leucémique médullaire reste débattue.

Au regard de cette nouvelle littérature, nous avons écrit une review afin de donner un aperçu des cellules et des facteurs importants qui participent à la genèse et à l'expansion de la LAL-T, en particulier dans la MO qui évolue selon la localisation anatomique, le vieillissement et enfin le stress auquel elle a été soumise.



Contents lists available at ScienceDirect

## Advances in Biological Regulation

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jbior](http://www.elsevier.com/locate/jbior)

## Desperately seeking a home marrow niche for T-cell acute lymphoblastic leukaemia

Julien Calvo<sup>a,b,c</sup>, Lucine Fahy<sup>a,b,c</sup>, Benjamin Uzan<sup>a,b,c</sup>, Françoise Pflumio<sup>a,b,c,\*</sup><sup>a</sup> UMRE008 Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, U1274 Inserm, Université de Paris, Université Paris-Saclay, CEA, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France<sup>b</sup> Laboratory of Hematopoietic Stem Cells and Leukemia, Team Niche and Cancer in Hematopoiesis, U1274, Inserm, CEA, 18 route du panorama, 92260, Fontenay-aux-Roses, France<sup>c</sup> Laboratoire labellisé par l'Association pour la Recherche sur le Cancer, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

T-ALL  
Thymus  
Bone marrow  
CXCL12  
IL7  
Adipocytes

## ABSTRACT

T-cell acute leukemia is a hematologic malignancy that results from the progressive acquisition of genomic abnormalities in T-cell progenitors/precursors. T-ALL is commonly thought to originate from the thymus albeit recent literature describes the possible acquisition of the first oncogenic hits in hematopoietic progenitor cells of the bone marrow (BM). The journey of T-ALL from its arising to full blown expansion meets different microenvironments, including the BM in which leukemic cells settle down early after the disease spreading. We take advantage of recent literature to give an overview of important cells and factors that participate in T-ALL, especially in the BM, arguing in favor of a home marrow niche for this rare leukemia.

## 1. Introduction

T-cell acute lymphoblastic leukaemia (T-ALL) constitutes a group of hematologic malignancies that result from the transformation of T cell progenitors. These pathologies concern children and adults. In the past twenty years, improvement in treatment protocols have contributed to a great amelioration of patient survival (Pui and Evans, 2013). Nevertheless, 15% of young patients and 45% of adults still relapse, which are of very bad prognosis (Litzow and Ferrando, 2015). Finding new ways to treat those patients is thus an important goal for ongoing research in the T-ALL field.

The knowledge accumulated from DNA sequencing and from functional T-ALL mouse models indicates that this blood disorder arises from the collaborative action of several oncogenic hits. Around 10–20 genomic abnormalities are the basis of this T-cell precursors' transformation (Girardi et al., 2017; Zhang et al., 2012). It is the accumulation of gain and loss of function of very diverse cell regulators that lead normal T cell precursors to lose their ability to fully differentiate into mature and functional T lymphocytes and to gain important survival and proliferative features, ultimately resulting in leukaemia (Belver and Ferrando, 2016; Girardi et al., 2017) (Fig. 1). It has long been admitted that T-ALL development occurs in the thymus where normal T cell differentiation takes place (Blom and Spits, 2006). Mouse models of early T-ALL development, using targeted oncogene expression in early T cells, such as in double negative (DN) CD4/CD8 thymocytes, have pointed these cells as putative cells of origin in certain T-ALL (McCormack et al., 2010; Tremblay et al., 2010). Experiments in which for instance LMO2 or LMO1 and TAL1 transcription factor expression was enforced in mouse DN3 T cell progenitors showed acquisition of self-renewal properties (Gerby et al., 2014; McCormack et al., 2010;

\* Corresponding author. Laboratoire des cellules souches hématopoïétiques et leucémiques – Team Niche et Cancer dans l'hématopoïèse, U1274 INSERM-IRCM, CEA, 18 route du Panorama, 92260, Fontenay-aux-Roses, France.

E-mail address: [francoise.pflumio@cea.fr](mailto:francoise.pflumio@cea.fr) (F. Pflumio).

<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100640>

Received 24 June 2019; Received in revised form 19 July 2019; Accepted 25 July 2019  
2212-4926/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

Tremblay et al., 2010), and further transformation required additional genomic modifications, such as *Notch1*, *KRAS* or *NRAS* mutations, implicated in T cell engagement or in signal transduction pathways (García-Ramírez et al., 2018). In humans, the question relative to T-ALL pre-leukemic/cell of origin has been challenged using two main strategies. In one hand, enforced expression of oncoproteins, such as NOTCH1/3, TLX3, TAL1/LMO2, in cord blood or bone marrow (BM) CD34<sup>+</sup> cells, forced to follow a T cell differentiation path using specific culture conditions or after transplantation in immune-deficient mice, was attempted as a way to dissect the early steps of T-ALL (De Smedt et al., 2002; García-Peydró et al., 2018; Pike-Overzet et al., 2007; Renou et al., 2017). Except for the work described in (García-Peydró et al., 2018), these attempts did not lead full blown leukaemia to develop, probably due to missing important secondary signals. However T cell progenitors accumulated as a result of a differentiation blockage and these progenitors were assimilated to pre-leukemic cells (De Smedt et al., 2002; Pike-Overzet et al., 2007; Renou et al., 2017). The second strategy, recently published, consisted in targeted sequencing of RNA from single hematopoietic CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> progenitor cells sorted from the BM of T-ALL patients. The results indicated that in half T-ALL tested, a few multipotent cells held a hand of mutations found in leukemic cells, outlining the fact that these BM stem/progenitors may be cells of origin in human T-ALL (De Bie et al., 2018). As a matter of fact, as T-ALL progresses from the first genomic hit to the full spectrum of mutations and further expands to invade the body, the leukemic cells are in close contact with different microenvironments - thymus and blood infiltrated organs, including BM - that may impact their intrinsic behaviour as well as their chemo-sensitivity to treatments (Fig. 2).

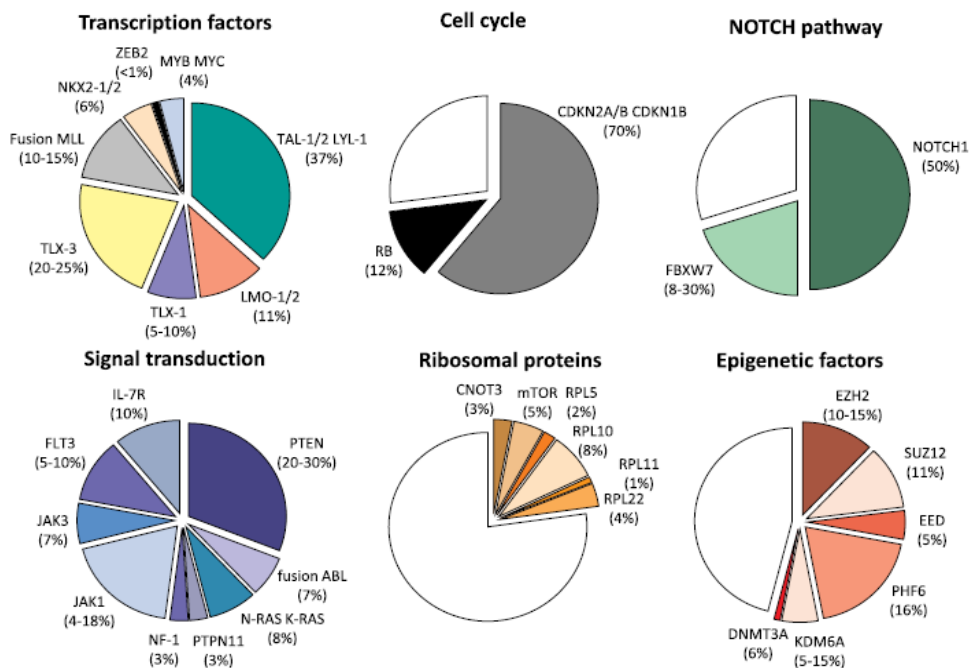


Fig. 1. Classification and frequencies of the main molecular targets of oncogenic abnormalities in T-ALL. Shown are the different factors distributed in categories being more or less frequently affected in leukemic cells.

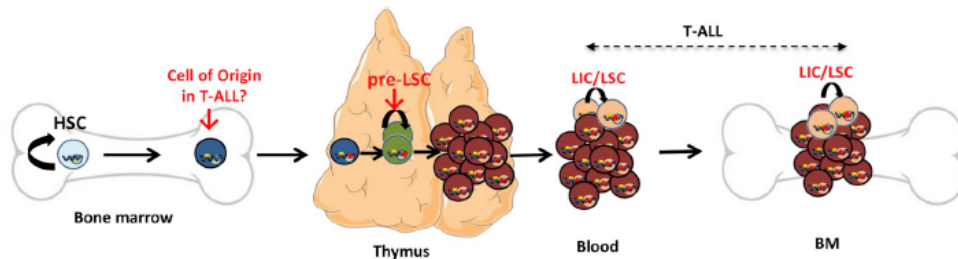


Fig. 2. Simplified model of T-ALL development starting in the BM, proceeding in the thymus and further invading BM again (adapted from García Ramírez I. et al., *Embo J.*, 2018).



Here we review the current knowledge of the relationships between the BM components and T-ALL. We especially focus our attention on late steps, when leukaemia has already spread in patient BM and blood. We question the current description of marrow niches of T-ALL.

## 2. BM: a place to go for T-ALL?

The diagnosis of leukaemia in patients copes with high infiltration rate of blood and BM (> 20%), by immature looking blood cells. In the case of T-ALL, the blast cells originate from the thymus where progressive genetic abnormalities, such as translocations, gene fusions and mutations, have gradually accumulated in T cell precursors leading to uncontrolled cell growth, proliferation, survival and differentiation arrest to a point where undifferentiated highly proliferating cells start invading the whole organism (Girardi et al., 2017). How leukemic cells quit the thymus to disseminate to other body sites and whether there is a specific migration to the BM, is still unclear (Passaro et al., 2016; Vadillo et al., 2018). What is much well known is how normal T cells transit within the thymus, from cortex to medulla, as they mature and how they eventually exit towards the blood when they reach their final differentiation stage (James et al., 2018). Upregulation of surface receptors such as CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and expression of Semaphorin 3E receptor PlexinD1 are crucial to the T cell precursors from the thymic cortex to enter the medulla rich area following a gradient of CCR7-ligands CCL19 and CCL21 and thus further progress in the differentiation (Choi et al., 2008; Kwan and Killeen, 2004; Ueno et al., 2004). In later T cell differentiation stages, differential expression of CD69, CD62L and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) allows mature T cells to leave the thymus and reach the blood circulation. Finely tuned S1P levels, the ligand of S1PR1, are necessary to avoid intrathymic accumulation of newly produced mature T cells, that is orchestrated by different cells, such as thymic epithelial, stromal and endothelial cells, the latest being the gate keeper between the thymic microenvironment and the blood circulation (James et al., 2018). Because T-ALL cells exit from the thymus is mostly restricted to pre-cortical or cortical precursors, i.e. that did not undergo sufficient differentiation to achieve the passage in the medulla, one can expect that mechanisms driving T-ALL emigration out of the thymus may involve molecules that are detected in the early steps of differentiation. CCR7 does not seem to be crucial in this phenomenon since deletion of CCR7 did not hamper Notch1-induced T-ALL migration, development and propagation. Only central nervous system invasion by T-ALL was modified in absence of CCR7 (Buonamici et al., 2009) albeit this result is debated (Jost et al., 2016). The chemokine receptor CXCR4 is widely expressed in newly diagnosed human T-ALL and in mouse models (Pitt et al., 2015) (and our own results) and its ligand CXCL12 is predominantly produced by the thymic cortex, and not by the medulla (Lucas et al., 2017). Albeit the role of CXCR4 in mature T cells exit from the thymus is debated (James et al., 2018), one may hypothesize that as leukaemia expands in the thymic cortex, a shortage in CXCL12 due to high consumption by pre-leukemic/leukemic cells may allow the “unfed” ones to start leaving the thymic environment and to find a lodgement in secondary CXCL12 producing niches, such as the BM. This “consumption” mechanism has been proposed to explain why the level of Interleukin 7 (IL7) is lower in the plasma of T-ALL patients compared to controls (Silva et al., 2011) as previous analyses showed IL7 circulating levels may be regulated by consumption (Park et al., 2004). Treatment of mice with the CXCR4 antagonist AMD3100 redistributes leukocytes from primary immune organs, such as thymus and BM, to secondary immune organs (Liu et al., 2015) indicating that preventing CXCR4 activation helps T cells to detach and recirculate. In the same idea, it is reported that T-ALL expansion perturbs the thymus architecture (García-Ramírez et al., 2018). In this context, cortical thymic epithelial cells (cTECs) may progressively be lost as a consequence of T-ALL intra-thymic development and because cTECs are CXCL12 producing cells (Lucas et al., 2017), their shortage during disease development may also lead to decreased levels of local consumable CXCL12 and help T-ALL cells to egress from the thymus.

## 3. BM: a place to be for T-ALL?

BM is a major site in which T-ALL leukemic cells are detected during the leukaemia process and after their intra-venous transplantation in mouse recipients (De Keersmaecker et al., 2010; Hawkins et al., 2016; Passaro et al., 2015; Poglio et al., 2016). Getting into the BM microenvironment requires many steps such as adhesion on endothelial cells and extravasation from the blood circulation to enter the bone cavity. Albeit these mechanisms are well described for normal patrolling T cells that enter lymph nodes, precise information is missing for T-ALL when invading the BM (Vadillo et al., 2018). Once in the BM, leukemic cells need to find a proper niche among the very diverse BM microenvironment that would allow them to survive and proliferate (Morrison and Scadden, 2014). Recent studies have described the localization of T-ALL cells close to BM perivascular stromal and vascular cells shortly after leukemic cell injection (Pitt et al., 2015). Even though vascular endothelial cells (VEC) are not the main source of CXCL12 in the BM (Ding and Morrison, 2013; Greenbaum et al., 2013; Tikhonova et al., 2019), Pitt and colleagues demonstrated that CXCL12 specifically produced by VEC is necessary for the maintenance and progression of T-ALL *in vivo* (Pitt et al., 2015). These results are reminiscent of the role of VEC-derived CXCL12 in maintaining hematopoietic stem cells (HSC) but are unexpected given that osteoblasts constitute a niche for lymphoid progenitors in BM (Ding and Morrison, 2013; Greenbaum et al., 2013). Conditional deletion of CXCL12 in VEC or treatment with a CXCR4 antagonist significantly decreased T-ALL propagation, indicating that VEC and production of CXCL12 are important for T-ALL development once BM is reached (Pitt et al., 2015). This observation fits with another study that showed an impact of CXCL12/CXCR4 in T-ALL migration, survival and expansion (Passaro et al., 2015). However, a more recent study that surveyed T-ALL localization close to osteoblasts, perivascular mesenchymal stem/progenitor cells and vasculature using intra-vital microscopy, reported stochastic distribution of leukemic cells relative to these three cell BM components, rather than stable niche, and a high motility rarely restricted to the vicinity of any specific cell types or structures (Hawkins et al., 2016). These controversial results are not explained by the leukemic models studied, as similar oncogenic activation was used to induce T-ALL from mouse progenitors and human T-ALL were as well studied in both works. One main difference is the mouse BM location in which

T-ALL initiation was explored, tibia vs calvaria (Hawkins et al., 2016; Pitt et al., 2015), which may imprint different behaviour to leukemic cells. A previous report showed substantial heterogeneity between calvaria and epiphyses and diaphysis of long bones in terms of bone remodelling activity, blood volume fraction and hypoxia (Lassailly et al., 2013). T-ALL are also very much dependent on a specific cytokine, that is IL7 (Barata et al., 2004, 2001). IL7 is crucial for normal T cell development and the expression of its receptor, IL7R $\alpha$ /CD127, varies in thymocytes according to the differentiation stages, being high in early T cells, lower in DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and re-induced in late SP mature T cells in accordance with the production of IL7 by cTECs (Akashi et al., 1998; James et al., 2018; Plum et al., 1996). So it is not surprising that about 70% of T-ALL, that are precursor T cells, express IL7R and respond to IL7 (Barata et al., 2004; Karawajew et al., 2000). *In vitro*, IL7 is a major cytokine to add in culture medium to grow T-ALL from patients (Armstrong et al., 2009; Scupoli et al., 2003; Yost et al., 2013) and recent development of a human anti-IL7R $\alpha$  antibody indicated efficient leukaemia cytotoxicity *in vitro* and delayed T-ALL development *in vivo* (Akkapeddi et al., 2019). Interestingly IL7/IL7R interaction does not similarly drive the activation of downstream STAT5, PI3K/Akt/mTOR and MEK/Erk pathways in normal and malignant states (Oliveira et al., 2019), indicating specific targeting of leukemic cells may be found. Notch activation, another important Receptor/ligand pathway in normal T cell differentiation (Radtko et al., 2010), is also implicated in T-ALL development, propagation and maintenance (Armstrong et al., 2009; Weng et al., 2004). It is expressed concomitantly to IL7/IL7R in the thymus compartments where they cooperate to induce proliferation of T cell progenitors while suppressing their non-T cell fates (García-Peydró et al., 2006), in relation with the fact that Notch1 signalling drives IL7R $\alpha$  expression in early T cells and leukaemia (González-García et al., 2009). Importantly, both *Notch1* and *IL7Ra* genes are targeted by gain of function mutations in T-ALL patients (Weng et al., 2004; Zenatti et al., 2011) further outlining the importance of both signalling pathways in supporting leukemia survival/expansion. Of note, *Notch1* mutations appear late during the oncogenic process, indicating cooperative effect with other premium genomic abnormalities (De Bie et al., 2018). Notch ligands Delta-like 1 and Delta-like 4 (DLL1, DLL4) that are the major ligands of Notch1 implicated in thymic T cell development, and IL7 are produced by different cells of the BM microenvironment. Indeed, single cell RNA sequencing analyses identified VE-cadherin positive endothelial cells as the exclusive DLL1/DLL4 expressing BM non-hematopoietic cells whereas IL7 is detected in Leptin receptor positive (LepR<sup>+</sup>) mesenchymal stromal/stem cells (MSC) (Baryawno et al., 2019; Tikhonova et al., 2019). DLL4 that has also been detected in osteoblastic cells (Yu et al., 2015) induces T-ALL expansion *in vitro* and *in vivo* (Minuzzo et al., 2015). Interestingly, CXCL12 is much more broadly expressed than the Notch ligands DLL4/DLL1 and IL7, but its highest expression is detected in LepR<sup>+</sup> cells that also produce IL7 (Tikhonova et al., 2019). This observation is supported by a recent paper describing the coincident production of IL7 and CXCL12 by unique peri-sinusoidal stromal cells, that aggregate pro-B cells and HSC at very close spots, representing another potential cellular niche for T-ALL (Balzano et al., 2019). Other growth factors/cytokines have been shown to help T-ALL to propagate. Insulin-growth factor 1 (IGF1) is one of them and its receptor is broadly expressed in T-ALL as a result of Notch1 activation (Medyouf et al., 2011) whereas transcripts of IGF1 are detected almost exclusively in osteoblastic cells (Tikhonova et al., 2019). Blocking or deleting IGF1 receptor in mouse T-ALL has major effects in the progression of leukemia *in vivo* with low leukemia-initiating activity being observed in such conditions (Medyouf et al., 2011). Interestingly, T-ALL can also contribute to its own growth through education of dendritic cells to secrete high IGF1 levels (Triplett et al., 2016). Speaking about cross-talks between the BM and T-ALL, an interesting finding concerns the implication of the pro-inflammatory cytokine, IL18, in T-ALL propagation. Indeed, a recent study described the presence of enhanced IL18 levels in the circulation of T-ALL patients (Uzan et al., 2014). IL18 receptor is expressed in T-ALL cells and interfering with its expression using a shRNA approach as well as blocking IL18 with a neutralizing antibody or using knock-out mice, greatly limits leukemia expansion in mouse and human T-ALL models (Uzan et al., 2014). IL18 is not produced by leukemic cells but rather by endogenous BM cells, including stromal cells (Uzan et al., 2014). Single cell RNA seq identified few IL18 expressing cells among LepR<sup>+</sup> stromal cells, indicating potential overlap with IL7 and CXCL12 producing cells (<http://aifantislabs.com/niche> from (Tikhonova et al., 2019)). As a sum up, T-ALL cells that home to BM can count on many different local interactions to help their growth and propagation, providing mechanistic clues on why the BM is a “warm nest” for this leukaemia (Fig. 3).

#### 4. BM, BM ... which BM are you talking about?

BM niches are numerous and very diverse in the human body, partly due to the architecture of the different bones. With aging, the BM composition changes and marrow niches become more and more infiltrated with adipose tissue; in the neonate, the BM is entirely hematopoietic and during the first year of life the conversion from hematopoietic, or red, to fatty, or yellow, marrow begins (Vogler and Murphy, 1988). The completion time of hematopoietic to adipocytic conversion is different if one considers the appendicular and the axial skeleton, the latest proceeds throughout life whereas the first one is over by the time of skeletal maturity (Laor and Jaramillo, 2009). Moreover the red to yellow marrow conversion follows a very specific pattern starting distally at the phalanges and moving centrally towards the axial skeleton. In bones such as humerus, sternum and clavicle, fatty transformation starts in the epiphysis, proceeds through the diaphysis and ends in the metaphysis (Zawin and Jaramillo, 1993). Thus looking at BM niches in a given (long) bone, at young adult time, in mouse, may only provide a limited, even though very informative, portrayal of the BM microenvironment at steady state or upon stressful conditions, such as after chemical myeloablation or after leukaemia development (Baryawno et al., 2019; Tikhonova et al., 2019; Zhou et al., 2017), and not taking into account the evident man to mouse bone architecture differences. With this caveats in mind, one may question whether the leukemic cells behave similarly in different bones, where for instance the BM red to yellow conversion state is not at the same levels. This question is important because BM adipocytes are known as modulators of BM cell components, such as osteoblastic and hematopoietic cells (Ambrosi et al., 2017). Interestingly a recent study investigated the metabolic and cell cycle state of T-ALL recovered from two different fat-containing mouse BM sites, i.e. thoracic and tail vertebrae, in mouse and xenograft models. Compared to thoracic/red BM, T-ALL cells from tail vertebrae/yellow BM



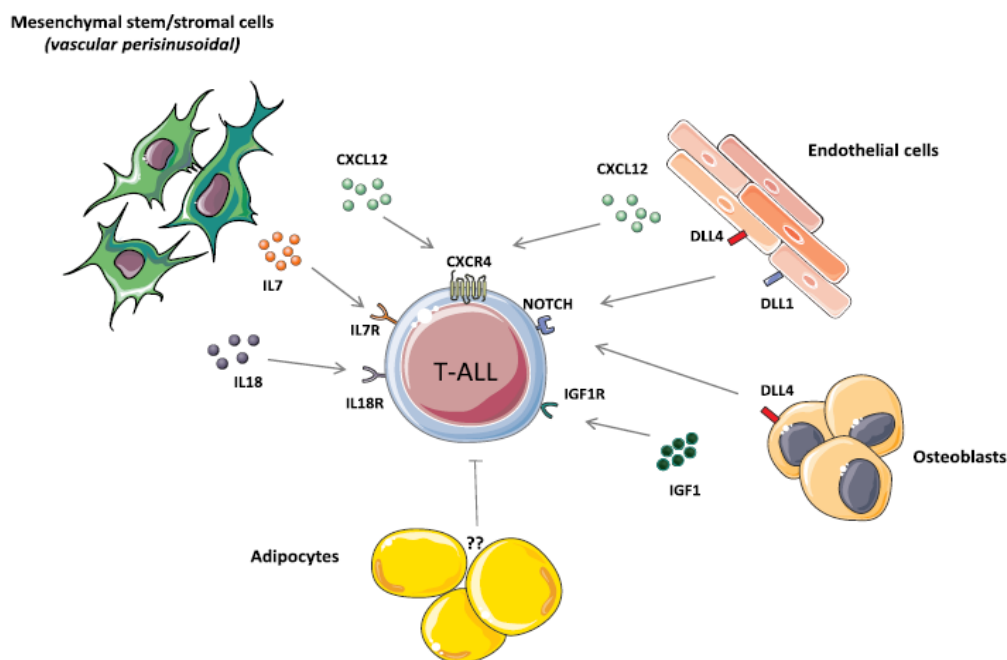


Fig. 3. Overview of extrinsic factors and non-hematopoietic BM cells known to regulate T-ALL (from Pitt et al., 2015; Passaro et al., 2015; Armstrong et al., 2009; Tikhonova et al., 2019; Cahu et al., 2017; Balzano et al., 2019; Medyouf et al., 2011; Passaro et al., 2015; Silva et al., 2011; Uzan et al., 2014; Baryoawno et al., 2019).

were in a lower metabolic and quiescent state that correlated with higher T-ALL intrinsic chemoresistance to cell cycle-targeting drugs (Cahu et al., 2017). This state was reversible upon cultures in permissive conditions and after secondary transplants, as leukemic cells reached long bones/red BM areas (Cahu et al., 2017). Albeit the exact mechanisms depicting the effect of the adipocyte-rich BM on T-ALL are currently unknown, these results are in line with recent analyses showing that BM adipocytes are negative regulators of the hematopoietic microenvironment (Naveiras et al., 2009). However, more recent studies showed that hematopoietic recovery after myeloablation is supported by BM adipocytes from long bones but not from caudal vertebrae that seem to influence not only hematopoiesis but also BM vascularization (Zhou et al., 2017). These last results indicate an even higher degree of variability between the BM cell content, even for well-known adipocyte lineage, outlining the difficulties of understanding the exact relationship between leukaemia and its microenvironment in bones. The study of leukaemia development in tail and thorax vertebrae also pinpoints the fact that when leukaemia treatment efficiency is assessed by BM aspiration in a defined bone spot, one may not forget that other infiltrated bones may provide another reality.

##### 5. BM and T-ALL marriage: not yet concluded?

Considering the signals available in the BM, it is thus expected that T-ALL are to go and stay in the medullary niches, some of them supporting chemoresistance during treatments. *Ex-vivo* experiments have shown that T-ALL in contact with MSC have low reactive oxygen species (ROS), in relation with enhanced mitochondrial fragmentation. Low ROS levels participate in MSC-mediated T-ALL resistance to aracytin and methotrexate (Cai et al., 2016). It has also been observed that leukemic cells may transfer mitochondria to MSC in presence of these drugs through intercellular nanotube formation, and this phenomenon decreases ROS levels in leukemic cells, similarly contributing to chemo resistance (Wang et al., 2018). Nevertheless, as mentioned earlier in the text, T-ALL cells, like grasshoppers in a fertile field, can devastate and reduce cell diversity. Studies have shown that in T-ALL invaded BM, osteoblasts disappear as a consequence of aberrant activation of Notch1 in osteoblastic progenitors, and this coincides with HSC/progenitor functional loss (Hawkins et al., 2016; Wang et al., 2016). Moreover, MSC isolated from the BM of T-ALL patients become senescent and are unable to differentiate into adipocytes, osteocytes and chondrocytes (Lim et al., 2016), a state that may be linked to massive mitochondrial transfer from leukemic cells to MSC (Wang et al., 2018). Interestingly, a similar mechanism was described to explain HSC protection from senescence in the BM niche, i.e. a direct transfer of ROS mediated by Connexin-43 from HSC to BM stromal cells (Taniguchi Ishikawa et al., 2012).

The remaining burning question is whether the “grasshopper effect” of T-ALL, that may not be restricted to this leukemia type, is totally reversible. Indeed, elimination of leukemic cells from the BM by chemotherapeutic agents may not fully restore the normal BM microenvironment supporting properties, leading to dysfunctional long term production of hematopoietic cells.



## 6. That's all folks!

Much efforts have been produced to understand the reciprocal relations between BM microenvironment and T-ALL in the recent years. The current results provide a still preliminary picture of the cell/factors exchanges that may be refined with the recent development of single cell analyses and of very precise intra-vital microscopy. Questions relative to the chemoprotection of leukemic cells by the diverse BM microenvironments are still pending but will undoubtedly be resolved in a near future. This may open to complementary strategies to target resistant cells in their home marrow nest.

## Contributions

F.P. and J.C. discussed and wrote the manuscript. L.F. and B.U. read the manuscript and gave important inputs.

## Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest.

## Acknowledgements

We wish to thank the LSHL lab members for the dynamic discussion generated around the writing process. We apologize to the colleagues whose work we did not cite, as a matter of space limitation. LF is a PhD fellow from Ligue Nationale Contre le Cancer. The team is funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Commissariat à l'Energie atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Université de Paris and Université Paris-Saclay, Institut du Cancer (INCA), and Association pour la Recherche contre le Cancer (Equipe labellisée ARC).

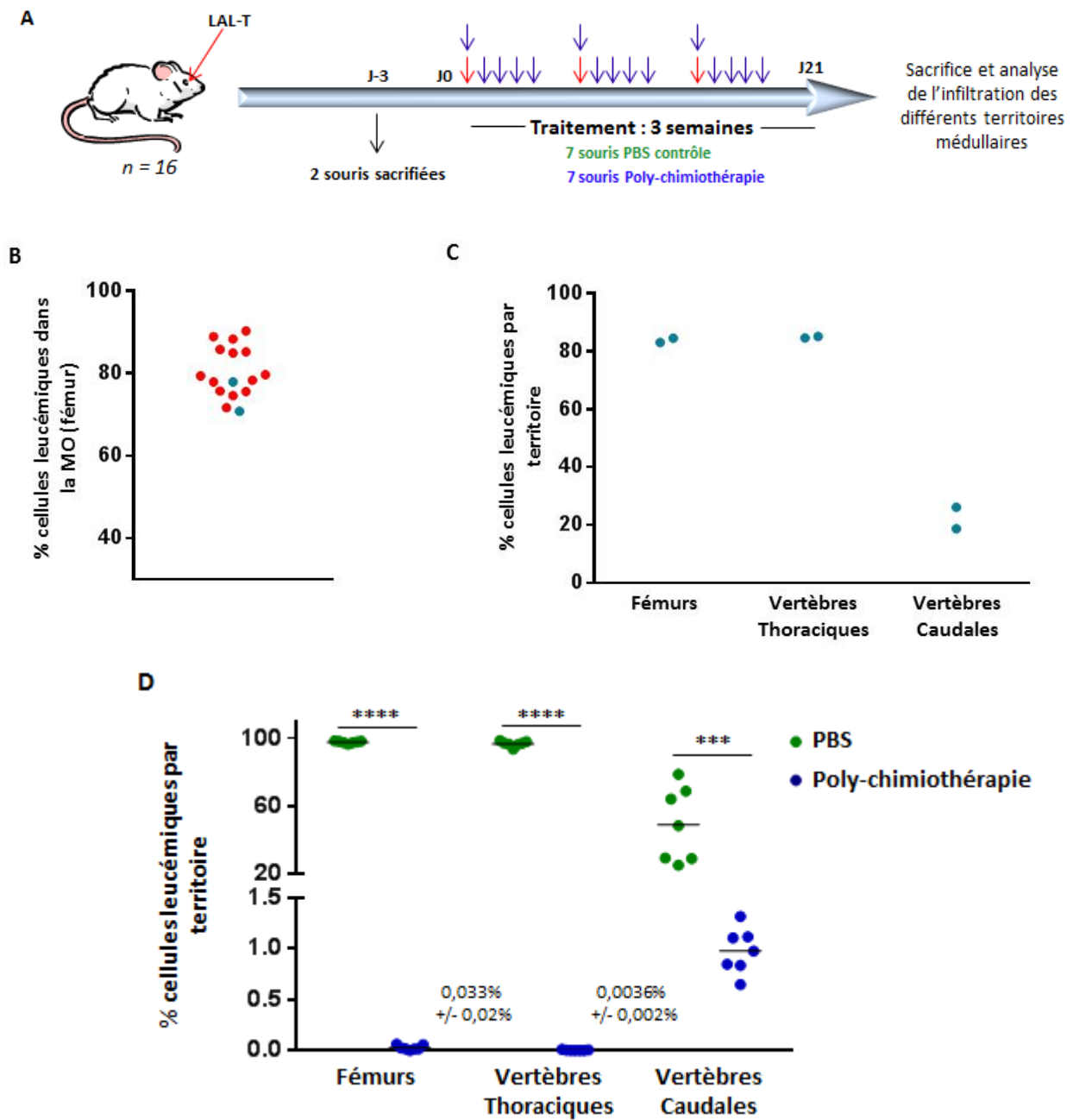
## References

- Akashi, K., Kondo, M., Weissman, I.L., 1998 Oct. Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. *Immunol Rev* 165, 13–28.
- Akkapeddi, P., Fragoso, R., Hixon, J.A., Ramalho, A.S., Oliveira, M.L., Carvalho, T., Gloger, A., Matasci, M., Corzana, F., Durum, S.K., Neri, D., Bernardes, G.J.L., Barata, J.T., 2019 Mar 8. A fully human anti-IL-7R $\alpha$  antibody promotes antitumor activity against T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0434-8> [Epub ahead of print].
- Ambrosi, T.H., Scialdone, A., Graja, A., Gohlke, S., Jank, A.-M., Bocian, C., Woelke, L., Fan, H., Logan, D.W., Schürmann, A., Saraiva, L.R., Schulz, T.J., 2017. Adipocyte accumulation in the bone marrow during obesity and aging impairs stem cell-based hematopoietic and bone regeneration. *Cell Stem Cell* 20, 771–784. e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.02.009>.
- Armstrong, F., Brunet de la Grange, P., Gerby, B., Rouyez, M.-C., Calvo, J., Fontenay, M., Boissel, N., Dombret, H., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Roméo, P.-H., Ballerini, P., Pflumio, F., 2009. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood* 113, 1730–1740. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-138172>.
- Balzano, M., De Grandis, M., Vu Manh, T.-P., Chasson, L., Bardin, F., Farina, A., Sergé, A., Bidaut, G., Charbord, P., Héroult, L., Bailly, A.-L., Cartier-Michaud, A., Boned, A., Dalod, M., Duprez, E., Genever, P., Coles, M., Bajenoff, M., Xerri, L., Aurrand-Lions, M., Schiff, C., Mancini, S.J.C., 2019. Nidogen-1 contributes to the interaction network involved in pro-B cell retention in the peri-sinusoidal hematopoietic stem cell niche. *Cell Rep.* 26, 3257–3271. e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.065>.
- Barata, J.T., Cardoso, A.A., Nadler, L.M., Boussiotis, V.A., 2001. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). *Blood* 98, 1524–1531. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.5.1524>.
- Barata, J.T., Keenan, T.D., Silva, A., Nadler, L.M., Boussiotis, V.A., Cardoso, A.A., 2004. Common gamma chain-signaling cytokines promote proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 89, 1459–1467.
- Baryawno, N., Przybylski, D., Kowalczyk, M.S., Kfoury, Y., Severe, N., Gustafsson, K., Kokkaliaris, K.D., Mercier, F., Tabaka, M., Hofree, M., Dionne, D., Papazian, A., Lee, D., Ashenberg, O., Subramanian, A., Vaishnav, E.D., Rozenblatt-Rosen, O., Regev, A., Scadden, D.T., 2019. A cellular taxonomy of the bone marrow stroma in homeostasis and leukemia. *Cell* 177, 1915–1932. e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.040>.
- Belver, L., Ferrando, A., 2016. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 16, 494–507. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.63>.
- Blom, B., Spits, H., 2006. Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 287–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090612>.
- Buonamici, S., Trimarchi, T., Ruocco, M.G., Reavie, L., Cathelin, S., Mar, B.G., Klinakis, A., Lukyanov, Y., Tseng, J.-C., Sen, F., Gehrie, E., Li, M., Newcomb, E., Zavadil, J., Meruelo, D., Lipp, M., Ibrahim, S., Efstratiadis, A., Zagzag, D., Bromberg, J.S., Dustin, M.L., Aifantis, I., 2009. CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature* 459, 1000–1004. <https://doi.org/10.1038/nature08020>.
- Cahu, X., Calvo, J., Poglio, S., Prade, N., Colsch, B., Arcangeli, M.-L., Leblanc, T., Petit, A., Baleydiere, F., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Junot, C., Larghero, J., Ballerini, P., Delabesse, E., Uzan, B., Pflumio, F., 2017. Bone marrow sites differently imprint dormancy and chemoresistance to T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv* 1, 1760–1772. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017004960>.
- Cai, J., Wang, J., Huang, Y., Wu, H., Xia, T., Xiao, J., Chen, X., Li, H., Qiu, Y., Wang, Y., Wang, T., Xia, H., Zhang, Q., Xiang, A.P., 2016. ERK/Drp1-dependent mitochondrial fission is involved in the MSC-induced drug resistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Dis.* 7, e2459. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.370>.
- Choi, Y.I., Duke-Cohan, J.S., Ahmed, W.B., Handley, M.A., Mann, F., Epstein, J.A., Clayton, L.K., Reinherz, E.L., 2008. PlexinD1 glycoprotein controls migration of positively selected thymocytes into the medulla. *Immunity* 29, 888–898. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.10.008>.
- De Bie, J., Demeyer, S., Alberti-Servera, L., Geerdens, E., Segers, H., Broux, M., De Keersmaecker, K., Michaux, L., Vandenberghe, P., Voet, T., Boeckx, N., Uytendaele, A., Cools, J., 2018. Single-cell sequencing reveals the origin and the order of mutation acquisition in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 32, 1358–1369. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0127-8>.
- De Keersmaecker, K., Real, P.J., Gatta, G.D., Palomero, T., Sulis, M.L., Tosello, V., Van Vlierberghe, P., Barnes, K., Castillo, M., Sole, X., Hadler, M., Lenz, J., Aplan, P.D., Kelliher, M., Kee, B.L., Pandolfi, P.P., Kappes, D., Gounari, F., Petrie, H., Van der Meulen, J., Speleman, F., Paietta, E., Racevskis, J., Wiernik, P.H., Rowe, J.M., Soulier, J., Avran, D., Cavé, H., Dastugue, N., Raimondi, S., Meijerink, J.P.P., Cordon-Cardo, C., Califano, A., Ferrando, A.A., 2010. The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation. *Nat. Med.* 16, 1321–1327. <https://doi.org/10.1038/nm.2246>.
- De Smedt, M., Reynvoet, K., Kerre, T., Taghon, T., Verhasselt, B., Vandekerckhove, B., Leclercq, G., Plum, J., 2002. Active form of Notch imposes T cell fate in human progenitor cells. *J. Immunol.* 169, 3021–3029. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.3021>.
- Ding, L., Morrison, S.J., 2013. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495, 231–235. <https://doi.org/>

- 10.1038/nature11885.
- García-Peydró, M., de Yébenes, V.G., Toribio, M.L., 2006. Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J. Immunol.* 177, 3711–3720. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3711>.
- García-Peydró, M., Fuentes, P., Mosquera, M., García-León, M.J., Alcain, J., Rodríguez, A., García de Miguel, P., Menéndez, P., Weijer, K., Spits, H., Scadden, D.T., Cuesta-Mateos, C., Muñoz-Calleja, C., Sánchez-Madrid, F., Toribio, M.L., 2018. The NOTCH1/CD44 axis drives pathogenesis in a T cell acute lymphoblastic leukemia model. *J. Clin. Investig.* 128, 2802–2818. <https://doi.org/10.1172/JCI92981>.
- García-Ramírez, I., Bhatia, S., Rodríguez-Hernández, G., González-Herrero, I., Walter, C., González de Tena-Dávila, S., Parvin, S., Haas, O., Woessmann, W., Stanulla, M., Schrappe, M., Dugas, M., Natkunam, Y., Orfao, A., Domínguez, V., Pintado, B., Blanco, O., Alonso-López, D., De Las Rivas, J., Martín-Lorenzo, A., Jiménez, R., García Criado, F.J., García Cenador, M.B., Lossos, I.S., Vicente-Dueñas, C., Borkhardt, A., Hauer, J., Sánchez-García, I., 2018. Lmo2 expression defines tumor cell identity during T-cell leukemogenesis. *EMBO J.* 37. <https://doi.org/10.15252/embj.201798783>.
- Gerby, B., Tremblay, C.S., Tremblay, M., Rojas-Sutterlin, S., Herblot, S., Hébert, J., Sauvageau, G., Lemieux, S., Lécuyer, E., Veiga, D.F.T., Hoang, T., 2014. SCL, LMO1 and Notch1 reprogram thymocytes into self-renewing cells. *PLoS Genet.* 10 e1004768. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004768>.
- Girardi, T., Vicente, C., Cools, J., De Keersmaecker, K., 2017. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood* 129, 1113–1123. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-706465>.
- González-García, S., García-Peydró, M., Martín-Gayo, E., Ballestar, E., Esteller, M., Bornstein, R., de la Pompa, J.L., Ferrando, A.A., Toribio, M.L., 2009. CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R(α) gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J. Exp. Med.* 206, 779–791. <https://doi.org/10.1084/jem.20081922>.
- Greenbaum, A., Hsu, Y.-M.S., Day, R.B., Schuettpelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., Link, D.C., 2013. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495, 227–230. <https://doi.org/10.1038/nature11926>.
- Hawkins, E.D., Duarte, D., Akinduro, O., Khorshed, R.A., Passaro, D., Nowicka, M., Straszowski, L., Scott, M.K., Rothery, S., Ruivo, N., Foster, K., Waibel, M., Johnstone, R.W., Harrison, S.J., Westerman, D.A., Quach, H., Gribben, J., Robinson, M.D., Purton, L.E., Bonnet, D., Lo Celso, C., 2016. T-cell acute leukaemia exhibits dynamic interactions with bone marrow microenvironments. *Nature* 538, 518–522. <https://doi.org/10.1038/nature19801>.
- James, K.D., Jenkinson, W.E., Anderson, G., 2018. T-cell egress from the thymus: should I stay or should I go? *J. Leukoc. Biol.* 104, 275–284. <https://doi.org/10.1002/JLB.1MR1217-496R>.
- Jost, T.R., Borga, C., Radaelli, E., Romagnani, A., Perruzza, L., Omodho, L., Cazzaniga, G., Biondi, A., Indraccolo, S., Thelen, M., Te Kronnie, G., Grassi, F., 2016. Role of CXCR4-mediated bone marrow colonization in CNS infiltration by T cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Leukoc. Biol.* 99, 1077–1087. <https://doi.org/10.1189/jlb.5MA0915-394R>.
- Karawajew, L., Ruppert, V., Wuchter, C., Kösser, A., Schrappe, M., Dörken, B., Ludwig, W.-D., 2000. Inhibition of in vitro spontaneous apoptosis by IL-7 correlates with Bcl-2 up-regulation, cortical/mature immunophenotype, and better early cytoreduction of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96, 297–306.
- Kwan, J., Killeen, N., 2004. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J. Immunol.* 172, 3999–4007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.3999>.
- Laor, T., Jaramillo, D., 2009. MR imaging insights into skeletal maturation: what is normal? *Radiology* 250, 28–38. <https://doi.org/10.1148/radiol.2501071322>.
- Lassailly, F., Foster, K., Lopez-Onieva, L., Currie, E., Bonnet, D., 2013. Multimodal imaging reveals structural and functional heterogeneity in different bone marrow compartments: functional implications on hematopoietic stem cells. *Blood* 122, 1730–1740. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-467498>.
- Lim, M., Pang, Y., Ma, S., Hao, S., Shi, H., Zheng, Y., Hua, C., Gu, X., Yang, F., Yuan, W., Cheng, T., 2016. Altered mesenchymal niche cells impede generation of normal hematopoietic progenitor cells in leukemic bone marrow. *Leukemia* 30, 154–162. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.210>.
- Litzow, M.R., Ferrando, A.A., 2015. How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 126, 833–841. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-551895>.
- Liu, Q., Li, Z., Gao, J.-L., Wan, W., Ganesan, S., McDermott, D.H., Murphy, P.M., 2015. CXCR4 antagonist AMD3100 redistributes leukocytes from primary immune organs to secondary immune organs, lung, and blood in mice. *Eur. J. Immunol.* 45, 1855–1867. <https://doi.org/10.1002/eji.201445245>.
- Lucas, B., White, A.J., Parnell, S.M., Henley, P.M., Jenkinson, W.E., Anderson, G., 2017. Progressive changes in CXCR4 expression that define thymocyte positive selection are dispensable for both innate and conventional αβ-T cell development. *Sci. Rep.* 7, 5068. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05182-7>.
- McCormack, M.P., Young, L.F., Vasudevan, S., de Graaf, C.A., Codrington, R., Rabbitts, T.H., Jane, S.M., Curtis, D.J., 2010. The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. *Science* 327, 879–883. <https://doi.org/10.1126/science.1182378>.
- Medyoun, H., Gusscott, S., Wang, H., Tseng, J.-C., Wai, C., Nemirovsky, O., Trumpp, A., Pflumio, F., Carboni, J., Gottardis, M., Pollak, M., Kung, A.L., Aster, J.C., Holzenberger, M., Weng, A.P., 2011. High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. *J. Exp. Med.* 208, 1809–1822. <https://doi.org/10.1084/jem.20110121>.
- Minuzzo, S., Agnusdei, V., Puscetdu, I., Pinazza, M., Moserle, M., Masiero, M., Rossi, E., Crescenzi, M., Hoey, T., Ponzoni, M., Amadori, A., Indraccolo, S., 2015. DLL4 regulates NOTCH signaling and growth of T acute lymphoblastic leukemia cells in NOD/SCID mice. *Carcinogenesis* 36, 115–121. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu223>.
- Morrison, S.J., Scadden, D.T., 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327–334. <https://doi.org/10.1038/nature12984>.
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., Daley, G.Q., 2009. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic micro-environment. *Nature* 460, 259–263. <https://doi.org/10.1038/nature08099>.
- Oliveira, M.L., Akkapeddi, P., Ribeiro, D., Melão, A., Barata, J.T., 2019. IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: an update. *Adv Biol Regul* 71, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2018.09.012>.
- Park, J.-H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J.S., Montoya-Durango, D., Grimes, H.L., Singer, A., 2004. Suppression of IL7Rα transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* 21, 289–302. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.016>.
- Passaro, D., Irigoyen, M., Catherinet, C., Gachet, S., Da Costa De Jesus, C., Lasgi, C., Tran Quang, C., Ghysdael, J., 2015. CXCR4 is required for leukemia-initiating cell activity in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 27, 769–779. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.05.003>.
- Passaro, D., Quang, C.T., Ghysdael, J., 2016. Microenvironmental cues for T-cell acute lymphoblastic leukemia development. *Immunol. Rev.* 271, 156–172. <https://doi.org/10.1111/immr.12402>.
- Pike-Overzet, K., de Ridder, D., Weerkamp, F., Baert, M.R.M., Versteegen, M.M.A., Brugman, M.H., Howe, S.J., Reinders, M.J.T., Thrasher, A.J., Wagemaker, G., van Dongen, J.J.M., Staal, F.J.T., 2007. Ectopic retroviral expression of LMO2, but not IL2Rγ, blocks human T-cell development from CD34+ cells: implications for leukemogenesis in gene therapy. *Leukemia* 21, 754–763. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404563>.
- Pitt, Lauren A., Tikhonova, A.N., Hu, H., Trimarchi, T., King, B., Gong, Y., Sanchez-Martín, M., Tsigos, A., Littman, D.R., Ferrando, A.A., Morrison, S.J., Fooksman, D.R., Aifantis, I., Schwab, S.R., 2015. CXCL12-Producing vascular endothelial niches control acute T cell leukemia maintenance. *Cancer Cell* 27, 755–768. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.05.002>.
- Plum, J., De Smedt, M., Leclercq, G., Verhasselt, B., Vandekerckhove, B., 1996 Dec 1. Interleukin-7 is a critical growth factor in early human T-cell development. *Blood* 88 (11), 4239–4245.
- Poglio, S., Lewandowski, D., Calvo, J., Caye, A., Gros, A., Laharanne, E., Leblanc, T., Landman-Parker, J., Baruchel, A., Soulier, J., Ballerini, P., Clappier, E., Pflumio, F., 2016. Speed of leukemia development and genetic diversity in xenograft models of T cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* 7, 41599–41611. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9313>.
- Pui, C.-H., Evans, W.E., 2013. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* 50, 185–196. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2013.06.007>.
- Radtke, F., Pasnacht, N., Macdonald, H.R., 2010. Notch signaling in the immune system. *Immunity* 32, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.01.004>.
- Renou, L., Boelle, P.-Y., Deswarte, C., Spicuglia, S., Benyoucef, A., Calvo, J., Uzan, B., Belhocine, M., Cieslak, A., Landman-Parker, J., Baruchel, A., Asnafi, V., Pflumio, F., Ballerini, P., Naguibneva, I., 2017. Homeobox protein TLX3 activates miR-125b expression to promote T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Advances* 1, 733–747. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017005538>.
- Scupoli, M.T., Vinante, F., Krampera, M., Vincenzi, C., Nadali, G., Zampieri, F., Ritter, M.A., Eren, E., Santini, F., Pizzolo, G., 2003. Thymic epithelial cells promote survival of human T-cell acute lymphoblastic leukemia blasts: the role of interleukin-7. *Haematologica* 88, 1229–1237.



- Silva, A., Laranjeira, A.B.A., Martins, L.R., Cardoso, B.A., Demengeot, J., Yunes, J.A., Seddon, B., Barata, J.T., 2011. IL-7 contributes to the progression of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Cancer Res.* 71, 4780–4789. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3606>.
- Taniguchi Ishikawa, E., Gonzalez-Nieto, D., Ghiaur, G., Dunn, S.K., Ficker, A.M., Murali, B., Madhu, M., Gutstein, D.E., Fishman, G.L., Barrio, L.C., Cancelas, J.A., 2012. Connexin-43 prevents hematopoietic stem cell senescence through transfer of reactive oxygen species to bone marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 9071–9076. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120358109>.
- Tikhonova, A.N., Dolgalev, I., Hu, H., Sivaraj, K.K., Hoxha, E., Cuesta-Domínguez, Á., Pinho, S., Akhmetzyanova, I., Gao, J., Witkowski, M., Guillamot, M., Gutkin, M.C., Zhang, Y., Marier, C., Diefenbach, C., Kousteni, S., Heguy, A., Zhong, H., Fooksman, D.R., Butler, J.M., Economides, A., Frenette, P.S., Adams, R.H., Satija, R., Tsrigras, A., Aifantis, I., 2019. The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature* 569, 222–228. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1104-8>.
- Tremblay, M., Tremblay, C.S., Herblot, S., Aplan, P.D., Hébert, J., Perreault, C., Hoang, T., 2010. Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes. *Genes Dev.* 24, 1093–1105. <https://doi.org/10.1101/gad.1897910>.
- Triplett, T.A., Cardenas, K.T., Lancaster, J.N., Hu, Z., Selden, H.J., Jasso, G.J., Balasubramanyam, S., Chan, K., Li, L., Chen, X., Marcogliese, A.N., Davé, U.P., Love, P.E., Ehrlich, L.I.R., 2016. Endogenous dendritic cells from the tumor microenvironment support T-ALL growth via IGF1R activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E1016–E1025. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520245113>.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H.D., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R.L., Takahama, Y., 2004. CCR7 signals are essential for cortex–medulla migration of developing thymocytes. *J. Exp. Med.* 200, 493–505. <https://doi.org/10.1084/jem.20040643>.
- Uzan, B., Poglio, S., Gerby, B., Wu, C.-L., Gross, J., Armstrong, F., Calvo, J., Cahu, X., Deswarte, C., Dumont, F., Passaro, D., Besnard-Guérin, C., Leblanc, T., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Ballerini, P., Baud, V., Ghysdael, J., Baleyrier, F., Porteu, F., Pflumio, F., 2014. Interleukin-18 produced by bone marrow-derived stromal cells supports T-cell acute leukaemia progression. *EMBO Mol. Med.* 6, 821–834. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303286>.
- Vadillo, E., Dorantes-Acosta, E., Pelayo, R., Schnoor, M., 2018. T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): new insights into the cellular origins and infiltration mechanisms common and unique among hematologic malignancies. *Blood Rev.* 32, 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.08.006>.
- Vogler, J.B., Murphy, W.A., 1988. Bone marrow imaging. *Radiology* 168, 679–693. <https://doi.org/10.1148/radiology.168.3.3043546>.
- Wang, J., Liu, X., Qiu, Y., Shi, Y., Cai, J., Wang, B., Wei, X., Ke, Q., Sui, X., Wang, Y., Huang, Y., Li, H., Wang, T., Lin, R., Liu, Q., Xiang, A.P., 2018. Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Hematol. Oncol.* 11, 11. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0554-z>.
- Wang, W., Zimmerman, G., Huang, X., Yu, S., Myers, J., Wang, Y., Moreton, S., Nthale, J., Awadallah, A., Beck, R., Xin, W., Wald, D., Huang, A.Y., Zhou, L., 2016. Aberrant Notch signaling in the bone marrow microenvironment of acute lymphoid leukemia suppresses osteoblast-mediated support of hematopoietic niche function. *Cancer Res.* 76, 1641–1652. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2092>.
- Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., Aster, J.C., 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306, 269–271. <https://doi.org/10.1126/science.1102160>.
- Yost, A.J., Shevchuk, O.O., Gooch, R., Gusscott, S., You, M.J., Ince, T.A., Aster, J.C., Weng, A.P., 2013. Defined, serum-free conditions for in vitro culture of primary human T-ALL blasts. *Leukemia* 27, 1437–1440. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.337>.
- Yu, V.W.C., Saez, B., Cook, C., Lotinun, S., Pardo-Saganta, A., Wang, Y.-H., Lympéri, S., Ferraro, F., Raaijmakers, M.H.G.P., Wu, J.Y., Zhou, L., Rajagopal, J., Kronenberg, H.M., Baron, R., Scadden, D.T., 2015. Specific bone cells produce DLL4 to generate thymus-seeding progenitors from bone marrow. *J. Exp. Med.* 212, 759–774. <https://doi.org/10.1084/jem.20141843>.
- Zawin, J.K., Jaramillo, D., 1993. Conversion of bone marrow in the humerus, sternum, and clavicle: changes with age on MR images. *Radiology* 188, 159–164. <https://doi.org/10.1148/radiology.188.1.8511291>.
- Zenatti, P.P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L., Silva, M.C., Paganin, M., Tritapoe, J., Hixon, J.A., Silveira, A.B., Cardoso, B.A., Sarmento, L.M., Correia, N., Toribio, M.L., Kobarg, J., Horstmann, M., Pieters, R., Brandalise, S.R., Ferrando, A.A., Meijerink, J.P., Durum, S.K., Yunes, J.A., Barata, J.T., 2011. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 43, 932–939. <https://doi.org/10.1038/ng.924>.
- Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., Lu, C., Chen, S.-C., Wei, L., Collins-Underwood, J.R., Ma, J., Roberts, K.G., Pounds, S.B., Ulyanov, A., Becksfort, J., Gupta, P., Huether, R., Kriwacki, R.W., Parker, M., McGoldrick, D.J., Zhao, D., Alford, D., Espy, S., Bobba, K.C., Song, G., Pei, D., Cheng, C., Roberts, S., Barbato, M.L., Campana, D., Coustan-Smith, E., Shurtleff, S.A., Raimondi, S.C., Kleppe, M., Cools, J., Shimano, K.A., Hermiston, M.L., Doulatov, S., Eppert, K., Laurenti, E., Notta, F., Dick, J.E., Basso, G., Hunger, S.P., Loh, M.L., Devidas, M., Wood, B., Winter, S., Dunsmore, K.P., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Hong, X., Harris, C.C., Dooling, D.J., Ochoa, K., Johnson, K.J., Obenaus, J.C., Evans, W.E., Pui, C.-H., Naeve, C.W., Ley, T.J., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., Mullighan, C.G., 2012. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 481, 157–163. <https://doi.org/10.1038/nature10725>.
- Zhou, B.O., Yu, H., Yue, R., Zhao, Z., Rios, J.J., Naveiras, O., Morrison, S.J., 2017. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nat. Cell Biol.* 19, 891–903. <https://doi.org/10.1038/ncb3570>.



**Figure 20** : Mise en place d'un protocole de poly-chimiothérapie des LAL-T greffées aux souris NSG. **A**. Plan expérimental du protocole adapté de (Samuels et al., 2014). Sont représentés en flèches rouges les injections en intraveineuses de Vincristine et Cytarabine (1 fois par semaine) et en bleus les injections de Dexaméthasone et L-asparaginase (5 fois par semaine). **B**. Pourcentage de prise de greffe dans la MO fémorale des souris transplantées par la LAL-T #3. **C**. Pourcentage d'infiltration par les cellules leucémiques de l'ensemble des territoires médullaires de ces 2 souris sacrifiées (retrouvées dans la figure 20 B en bleu clair). **D**. Pourcentage de cellules leucémiques retrouvées dans les différents territoires médullaires à l'issue de 3 semaines de traitement. En vert sont représentées les souris « Contrôles » et en bleu, les souris traitées avec la poly-chimiothérapie. Test statistique : Bonferroni's multiple comparisons test. \*\*\* :  $p < 0.005$ , \*\*\*\* :  $p < 0.001$ .

# Résultats

---

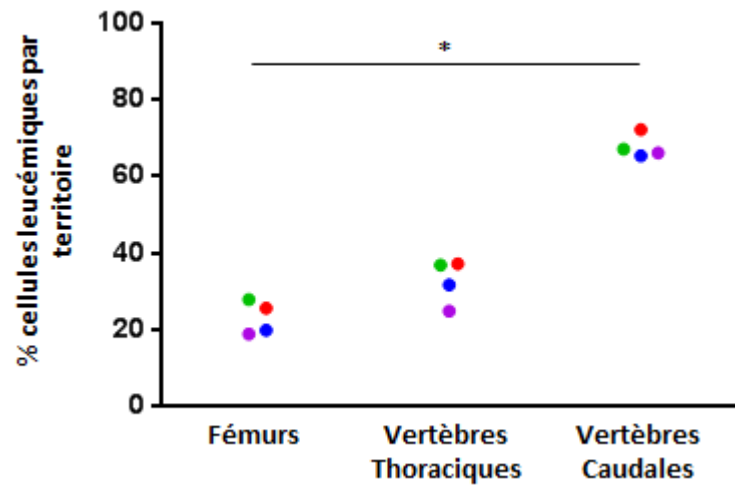
## I. Les vertèbres caudales protègent *in vivo* les cellules leucémiques des chimiothérapies.

Nous avons montré que les cellules leucémiques issues de la MO riche en adipocytes sont intrinsèquement chimiorésistantes. En effet, à l'issue des traitements *ex vivo* avec la Vincristine et la Cytarabine, les cellules ayant pour origine les vertèbres caudales entrent moins en apoptose que les cellules extraites des vertèbres thoraciques. En résulte alors un plus grand nombre de cellules vivantes. Nous avons aussi montré que les cellules leucémiques des deux territoires médullaires étaient génétiquement similaires. L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que l'éducation des cellules leucémiques par le microenvironnement médullaire riche en adipocytes entraîne une chimiorésistance intrinsèque des cellules leucémiques (Cahu et al., 2017).

Afin de savoir si les cellules leucémiques des vertèbres caudales sont aussi protégées *in vivo* contre les agents chimiothérapeutiques, nous avons adapté un protocole de chimiothérapie utilisé chez la souris qui combine l'injection de Vincristine, Cytarabine, Dexaméthasone et L-asparaginase, mimant les traitements chez l'homme (Samuels et al., 2014). Le protocole a consisté à injecter la Vincristine et la Cytarabine une fois par semaine par voie intraveineuse et la L-Asparaginase et la Dexaméthasone cinq fois par semaine par la voie intra-péritonéale. Nous avons pris soin de débiter le traitement lorsque les cellules leucémiques commencent à envahir les vertèbres caudales (**Figure 20A-C**).

En effet, dans la première expérience, nous avons transplanté les cellules de la LAL-T #3. Le prélèvement itératif de MO environ 3 semaines après la transplantation a permis de montrer une infiltration de 40% à 90% pour l'ensemble des souris (**Figure 20B**). De plus, avant de commencer le traitement, deux souris ont été sacrifiées afin d'analyser l'infiltration des différents territoires par les cellules leucémiques (points bleus, **Figure 20B et 20C**). A ce stade, les fémurs et les vertèbres thoraciques étaient envahis par les cellules leucémiques à hauteur de 85% alors que les vertèbres caudales étaient infiltrées à 20% (**Figure 20C**). Les groupes des souris contrôle (traitées au PBS) et le groupe des souris traitées par la poly-chimiothérapie ont été constitués en répartissant les souris dans deux groupes homogènes par rapport au % de cellules leucémiques dans la MO fémorale.

A l'issue de 3 semaines de traitement, nous avons observé une diminution drastique du pourcentage d'infiltration par les cellules leucémiques dans les différentes MO des souris traitées à la poly-chimiothérapie comparées aux souris contrôle (**Figure 20D**). Malgré la



**Figure 21** : Pourcentage de cellules leucémiques de LAL-T #1 retrouvées dans les différents territoires médullaires à l'issue de 2 semaines de traitements par la polychimiothérapie. Chaque souris possède son code couleur. Test statistique : Bonferroni's multiple comparisons test. \* :  $p < 0,05$ .



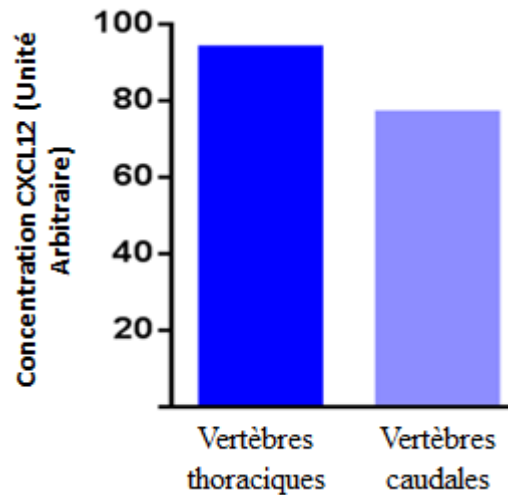
faible proportion de cellules leucémiques retrouvée dans les différents territoires après chimiothérapie, le pourcentage de cellules leucémiques retrouvé après traitement dans les vertèbres caudales (0.9% +/- 0.4%) est plus important que ceux observés dans les fémurs et les vertèbres thoraciques, respectivement 0.033% (+/- 0.02%) et 0.0036% (+/- 0.002%). Par conséquent, la diminution du pourcentage d'infiltration dans les vertèbres caudales suite au traitement est moins importante que dans les deux autres territoires. Ce résultat peut s'expliquer par 1) une véritable chimioprotection des cellules leucémiques logées dans la MO adipocytaire des vertèbres caudales et 2) un retour de l'hématopoïèse murine dans les MO pauvres en adipocytes.

La sensibilité à la chimiothérapie diffère selon l'échantillon de patient utilisé. La réduction de la durée du protocole ainsi que l'utilisation d'une autre leucémie (LAL-T #1) a permis de mettre en évidence des variations de sensibilité des cellules leucémiques selon les sites médullaires analysés (**Figure 21**). Lors du sacrifice à l'échéance de 2 semaines de traitement, le pourcentage de cellules leucémiques retrouvées dans les fémurs et les vertèbres thoraciques est respectivement de **23%** (+/- 4%) et **31%** (+/- 4%) alors qu'il est de **68%** (+/- 4%) dans les vertèbres caudales. Ce résultat diffère de l'expansion classique de cette leucémie dans les souris puisque, au moment du sacrifice, les souris présentent normalement plus de 90 % d'infiltration de cellules leucémiques dans l'ensemble des territoires médullaires (cf Figure 1 de (Cahu et al., 2017)). Bien que la réponse des cellules leucémiques à notre modèle de poly-chimiothérapie *in vivo* diffère entre les LAL-T testées, les résultats obtenus avec les deux LAL-T (#1, #3) permettent de montrer que la chimiorésistance des cellules leucémiques mesurée dans la publication *ex vivo* est aussi mesurable *in vivo* dans les vertèbres caudales.

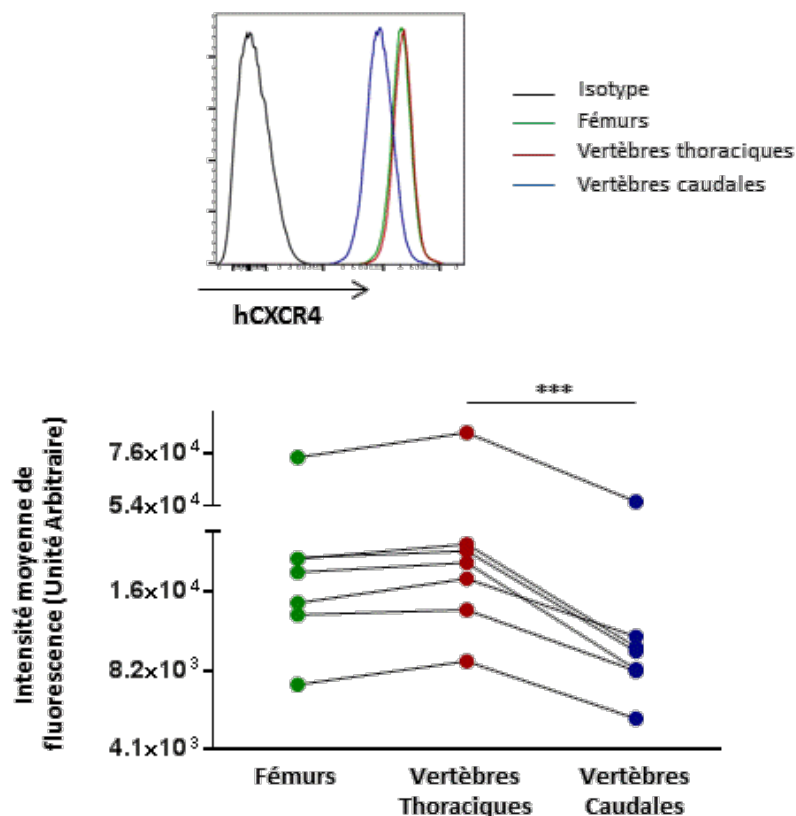
## II. Mobilisation des cellules leucémiques : axe CXCR4/CXCL12

Les cellules leucémiques localisées dans les niches adipocytaires sont dans un état métabolique qui leur confère une chimiorésistance. Une des façons de modifier cet état serait de les faire sortir de ce sanctuaire médullaire afin de les rendre disponibles et plus accessibles aux agents chimio-thérapeutiques. Ce d'autant que nous avons montré que les caractéristiques induites par la MO adipocytaire étaient réversibles dès lors que les cellules leucémiques se retrouvent dans un autre environnement (Cahu et al., 2017). La stratégie que nous avons adoptée a donc été de mobiliser les cellules leucémiques hors des MO, en particulier celles logées dans les vertèbres caudales.

L'axe majeur d'entrée et de sortie de la MO des LAL-T est la voie CXCR4/CXCL12 (Passaro et al., 2015, Pitt et al., 2015). La molécule chimique AMD 3100 (Plerixafor ou



**Figure 22** : Mesure semi quantitative de la concentration de CXCL12 dans des broyat de vertèbres thoraciques et caudales. 6 vertèbres thoraciques et 6 vertèbres caudales ont été broyées. La concentration de CXCL12 a été évaluée par la technique de cytokines array (R&Dsystem).

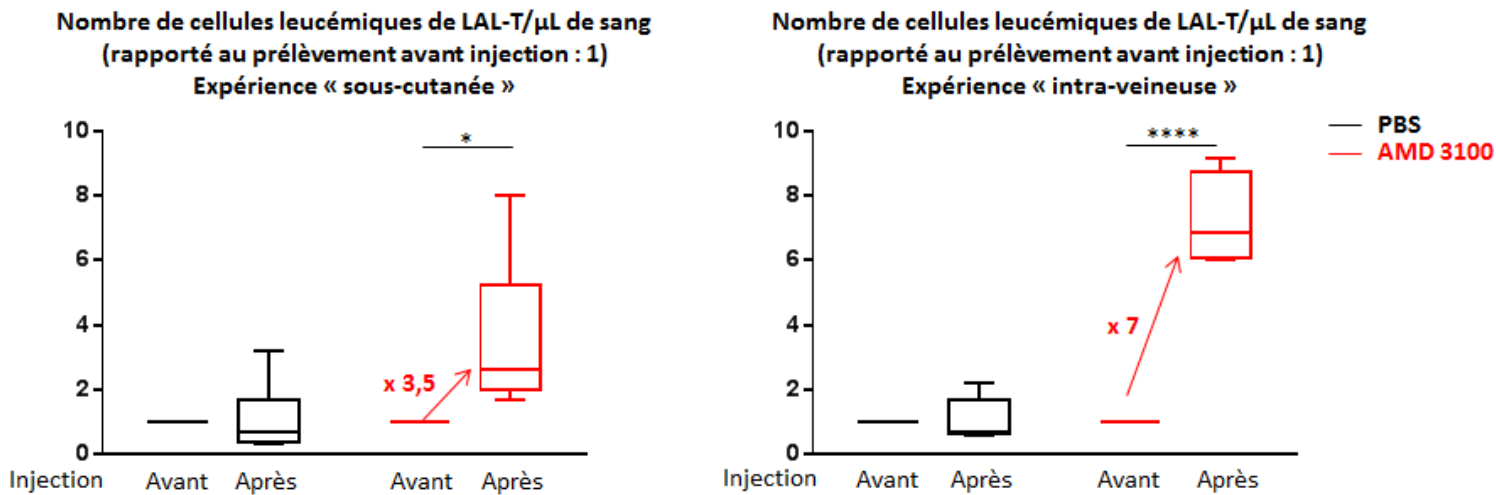


**Figure 23** : Expression totale (intra- et extra-cellulaire) de la protéine CXCR4 analysée en cytométrie en flux. Le panel du haut correspond à un exemple de marquage de la protéine CXCR4 des cellules fixées et perméabilisées de LAL-T #1 issues des différents territoires médullaires obtenu en cytométrie en flux. Le panel du bas récapitule l'ensemble des résultats obtenus avec 4 LAL-T (# 1, #2, #3, #5). En vert sont représentées les cellules issues des fémurs, en rouge des vertèbres thoraciques et en bleu des vertèbres caudales. Test statistique : Bonferroni's multiple comparisons test. \*\*\* : p<0,001.

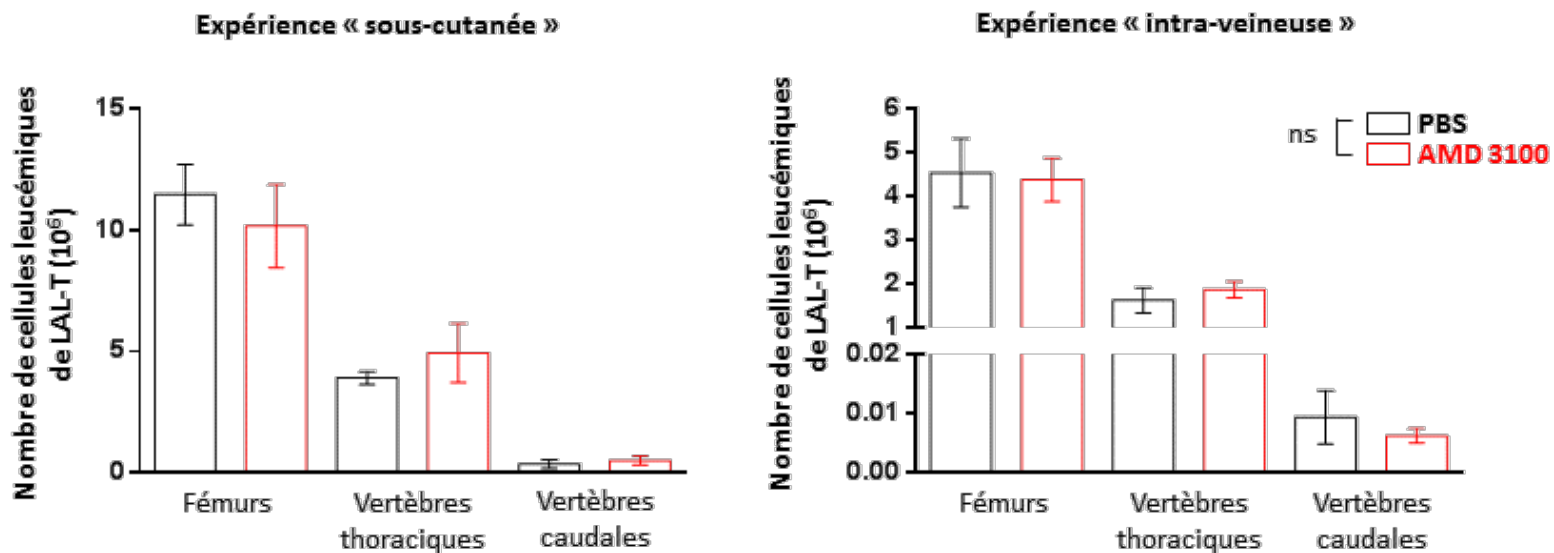
Mozobil) empêche l'activité de CXCL12 en se fixant sur la partie extra-cellulaire du CXCR4 et permet ainsi de mobiliser dans le sang périphérique les CSPHs de la MO (Flomenberg et al., 2005). L'utilisation de cette molécule est un choix stratégique puisque les cellules leucémiques des vertèbres caudales présentent à leur surface une expression protéique de CXCR4 moins importante que les cellules leucémiques logées dans les vertèbres thoraciques ou les fémurs (Cahu et al., 2017). Notre hypothèse était qu'une mobilisation plus importante ou à minima au moins égale des cellules leucémiques de ce territoire médullaire était possible en comparaison à la mobilisation obtenue avec les cellules leucémiques des autres sites de MO. Il est à noter également que les concentrations du ligand CXCL12 mesurées dans les deux types de vertèbres (thoraciques et caudales) sont strictement comparables (**Figure 22**).

L'expression protéique de CXCR4 à la surface étant moins importante pour les cellules leucémiques extraites des vertèbres caudales comparées aux vertèbres thoraciques (Cahu et al., 2017) et CXCR4 étant un récepteur présent à la surface des cellules qui peut être internalisé en vue d'être soit dégradé soit recyclé à la surface (Cojoc et al., 2013), nous avons voulu mesurer l'expression protéique totale (surface et intra-cellulaire) de CXCR4. Nous avons fixé et perméabilisé les cellules leucémiques extraites des différents territoires médullaires et analysé l'expression de CXCR4 par cytométrie en flux. Les résultats indiquent que les cellules leucémiques des vertèbres caudales présentent moins d'expression de CXCR4 total en comparaison aux cellules issues des vertèbres thoraciques (**Figure 23**).

Etant donné cette expression faible de CXCR4, nous avons posé l'hypothèse que la mobilisation des cellules leucémiques à partir des vertèbres caudales est plus efficace et requiert moins d'AMD 3100. Pour tester cette hypothèse, nous avons appliqué un protocole d'utilisation de l'AMD 3100 *in vivo* adapté de celui utilisé pour mobiliser les CSPHs humaines ou murines ainsi que les cellules leucémiques de LAL-B chez la souris (Broxmeyer et al., 2005; Juarez et al., 2007). Ce protocole consiste à injecter de l'AMD 3100 en sous-cutané ou en intraveineux respectivement à 5 ou 3mg/kg (Broxmeyer et al., 2005). Les deux voies d'injection de l'AMD 3100 ont été utilisées car nous voulions nous assurer que la voie de délivrance de l'AMD 3100 ne risquait pas de compromettre le résultat. Pour étudier la mobilisation des cellules leucémiques par l'AMD 3100, nous avons transplanté des cellules leucémiques de LAL-T #1 à des souris NSG et attendu que les souris présentent un envahissement de la MO fémorale >70% qui corrèle avec un envahissement de l'ensemble des territoires médullaires étudiés, dont les vertèbres caudales (cf Figure 1 de (Cahu et al., 2017)), avant de traiter les souris. En pratique, dans chaque expérience, 12 souris ont été



**Figure 24** : Mobilisation *in vivo* des cellules leucémiques de LAL-T #1 après injection de PBS ou AMD 3100. Les résultats présentés correspondent à l'injection de l'AMD 3100 et le PBS en sous-cutanée (Panel de Gauche) et en intra-veineuse (Panel de Droite). Les résultats des deux groupes sont rapportés au nombre de cellules leucémiques circulantes avant traitement. En noir est représenté le résultat obtenu avec 6 souris contrôles (PBS) et en rouge les 6 souris injectées avec l'AMD 3100. Test statistique : Bonferroni's multiple comparisons test. \* :  $p < 0,05$  , \*\*\*\* :  $p < 0.001$ .



**Figure 25** : Analyse du nombre de cellules leucémiques détectées dans chaque territoire médullaire étudié 1 heure après injection du PBS ou de l'AMD 3100. Injection de PBS (colonnes noires) et d'AMD 3100 (colonnes rouges) par la voie sous-cutanée (Gauche) ou intra-veineuse (Droite). Test statistique : Bonferroni's multiple comparison test. ns : non significatif.

réparties en deux groupes, un groupe contrôle (6 souris), injecté avec le diluant de l'AMD 3100, du PBS, et un groupe traité (6 souris), injecté avec de l'AMD 3100. Les deux protocoles d'injection ont donné des résultats similaires (**Figure 24**).

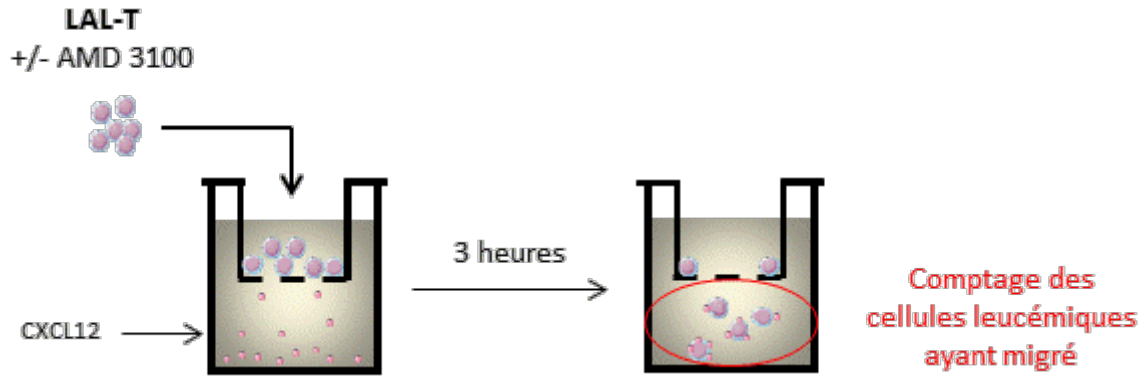
Un premier prélèvement sanguin a été effectué avant et un second une heure après l'injection de PBS ou d'AMD 3100 afin d'évaluer le pourcentage de cellules leucémiques circulantes des souris des deux groupes en cytométrie en flux. Les cellules leucémiques sont identifiées sur la base de la co-expression à leur surface des clusters de différenciation CD45 (pan hématopoïétique) et CD7 (pan lymphocyte T). L'injection de l'AMD 3100 en sous-cutanée induit une augmentation significative – d'un facteur 3,5 - du nombre de cellules leucémiques dans la circulation sanguine en comparaison au nombre de cellules leucémiques mesuré avant traitement (**Figure 24**). En pratique l'injection de l'AMD 3100 induit une augmentation de  $9.10^6$  cellules leucémiques supplémentaires, donc mobilisées, dans la circulation sanguine.

Lors du sacrifice réalisé une heure après le traitement, nous avons mesuré l'infiltration leucémique dans les fémurs, les vertèbres thoraciques et caudales des souris par cytométrie en flux comme expliqué dans (Cahu et al., 2017). Pour le groupe des souris contrôles, le nombre moyen de cellules leucémiques  $CD45^+CD7^+$  retrouvées dans les fémurs, les vertèbres thoraciques et caudales étaient respectivement de  $11,5.10^6$ ;  $4.10^6$  et  $0,4.10^6$  ( $\pm 1,2.10^6$  cellules;  $0,3.10^6$  cellules;  $0,2.10^6$  cellules; valeurs de S.E.M.). Quant aux souris traitées avec l'AMD 3100, le nombre moyen de cellules  $CD45^+CD7^+$  retrouvées dans les fémurs, les vertèbres thoraciques et caudales étaient respectivement de  $10,2.10^6$ ;  $4,9.10^6$  et  $0,5.10^6$  ( $\pm 1,7.10^6$  cellules;  $1,2.10^6$  cellules;  $0,2.10^6$  cellules; S.E.M.). Ainsi, aucune différence significative du nombre de cellules leucémiques humaines dans les territoires médullaires n'a été détectée entre les souris traitées AMD 3100 et les souris contrôles (**Figure 25**). Comme indiqué précédemment, l'expérience a été reproduite mais l'AMD 3100 (3mg/kg) et le PBS ont été injectés par la voie intraveineuse, décrite comme plus reproductible (Ramirez et al., 2009). Cette seconde expérience a débuté avec des souris qui présentaient une infiltration de la MO fémorale d'environ 25% ( $\pm 4\%$ ), donc moindre que le groupe de souris traité avec de l'AMD 3100 par la voie sous-cutanée. Elle a donné les mêmes résultats que l'expérience précédente. En effet, les cellules leucémiques ont été mobilisées de façon importante dans la circulation sanguine – augmentation d'un facteur 7 - (**Figure 24**) sans pour autant impacter le nombre absolu de cellules leucémiques mesurées dans chaque territoire médullaire étudié (**Figure 25**). Dans l'expérience d'injection de l'AMD 3100 par voie intraveineuse, le facteur de mobilisation obtenu fut plus important que dans l'expérience

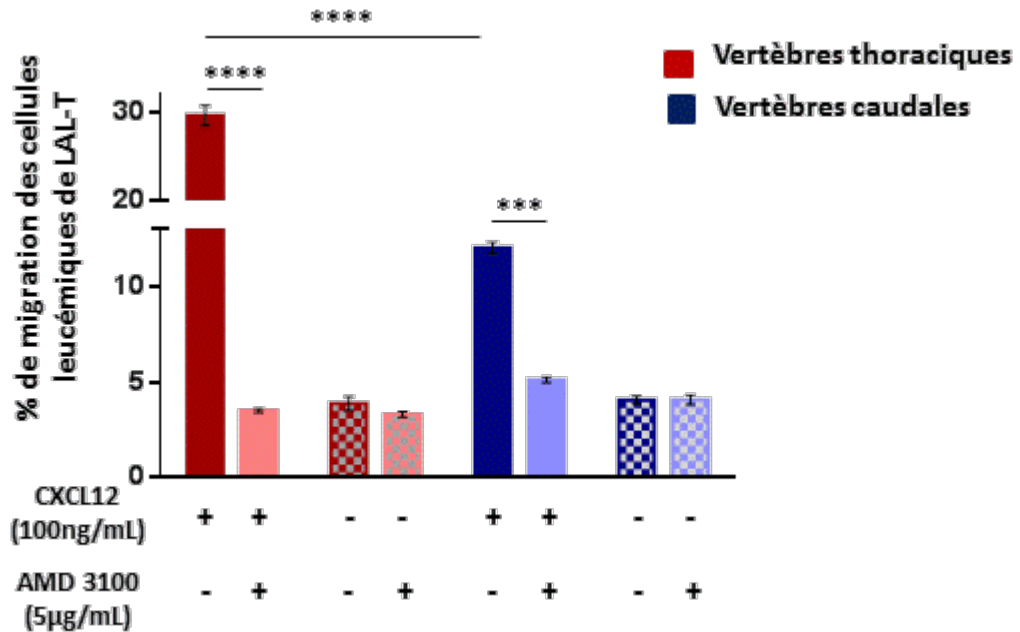
d'injection en sous-cutanée. Cela peut s'expliquer par le fait que **1)** la voie d'administration est plus efficace et **2)** le degré d'infiltration leucémique des souris était moins important. En effet, le nombre de cellules leucémiques retrouvées lors du prélèvement sanguin avant mobilisation était en moyenne de  $0.026 \cdot 10^3/\mu\text{L}$  de sang alors que dans la première expérience celui-ci était en moyenne de  $2.49 \cdot 10^3/\mu\text{L}$  de sang. Soit environ 100 fois plus. Ainsi, l'injection de l'AMD 3100 en SC et en IV a permis de mobiliser respectivement environ  $8 \cdot 10^3$  et  $0.16 \cdot 10^3$  cellules leucémiques/ $\mu\text{L}$  de sang.

L'ensemble de ces résultats montre de façon originale que des cellules de LAL-T sont mobilisables dans la circulation sanguine des souris NSG grâce à l'injection d'AMD 3100. En revanche, cette mobilisation n'est pas assez importante pour impacter le taux de cellules leucémiques retrouvées dans les sites médullaires étudiés.





**Figure 26** : Plan expérimental de l'étude de la migration des cellules leucémiques de LAL-T issues des vertèbres thoraciques ou caudales induite par CXCL12 en chambre de Boyden. Les cellules leucémiques sont pré-traitées ou non pendant 30 min à 37 °C avec de l'AMD 3100 (5µg/mL) puis incubées pendant 3 heures à 37 °C dans la partie supérieure du Transwell®. Celui-ci est immergé dans un puits contenant du milieu de culture +/- CXCL12 (100ng/mL).



**Figure 27** : Migration *in vitro* des cellules leucémiques de LAL-T #5 issues des vertèbres thoraciques (en rouge) et caudales (en bleu foncé) pré-traitées ou non à l'AMD 3100 (à damier ou plein) en chambre de Boyden (cf Figure 7). Le résultat obtenu est représentatif des résultats obtenus avec 3 LAL-T différentes (#5, #15, #16). Test statistique : Bonferroni's multiple comparisons test. \*\*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,001$ .

### III. Analyse fonctionnelle de la diminution d'expression de surface de CXCR4.

#### III.1. Analyse fonctionnelle de l'axe CXCR4/CXCL12 *in vitro* sur les cellules leucémiques issues des vertèbres thoraciques et caudales.

La diminution d'expression du récepteur CXCR4 à la surface des cellules de LAL-T inhibe l'expansion de ces cellules *in vitro* en induisant d'une part l'apoptose mais en diminuant également la progression dans le cycle cellulaire (Passaro et al., 2015). Ce dernier paramètre peut donc participer à l'augmentation de la quiescence et par extension à la chimiorésistance que nous observons dans les vertèbres caudales des souris.

Etant donné la diminution d'expression du récepteur CXCR4 à la surface des cellules leucémiques issues des vertèbres caudales comparée à celle des vertèbres thoraciques, nous avons voulu savoir si ce niveau d'expression plus faible impactait la migration des cellules leucémiques en réponse au ligand CXCL12. Pour répondre à cette question nous avons utilisé le plan expérimental présenté en **Figure 26**.

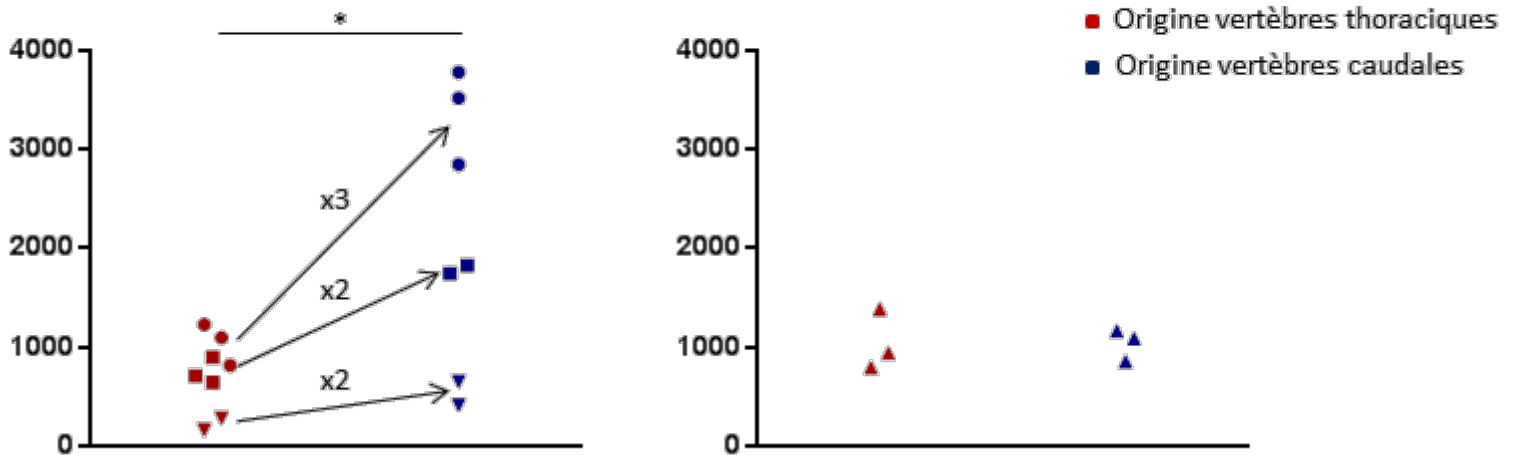
L'expérience a été effectuée à partir de 3 LAL-T différentes (LAL-T #5, #15 et #16). Le résultat obtenu avec les cellules de la LAL-T #5 est représentatif des expériences effectuées (**Figure 27**).

Concernant les cellules leucémiques issues des vertèbres thoraciques, le taux de migration de cette leucémie est d'environ 30% (+/- 0,6%) (histogramme rouge foncé dans la Figure). Le pré-traitement de ces cellules à l'AMD 3100 entraîne une diminution significative de la migration. Dans cette condition, la migration est de seulement 3,5% (+/- 0,2%). Dans la condition où les cellules leucémiques sont incubées dans un milieu sans CXCL12 plus ou moins le pré-traitement à l'AMD 3100, le pourcentage de migration est également d'environ 3%. Ainsi, le pré-traitement des cellules des vertèbres thoraciques à l'AMD 3100 abroge complètement la migration induite par CXCL12, le reste correspondant à la migration spontanée (sans CXCL12).

Concernant les cellules leucémiques issues des vertèbres caudales, le pourcentage de migration obtenu dans la première condition est de 12% (+/- 0,5%) soit environ deux fois moins que les cellules leucémiques issues des vertèbres thoraciques. Dans la condition de pré-traitement à l'AMD 3100, le pourcentage de migration est alors de seulement 5% ce qui n'est pas significativement différent des migrations spontanées obtenues dans les conditions sans exposition des cellules au CXCL12.

Les cellules leucémiques issues des vertèbres thoraciques et caudales migrent donc en réponse au chimiotactisme induit par CXCL12. Cette migration est significativement moins importante pour les cellules des vertèbres caudales comparées aux vertèbres thoraciques. Ce

**Nombre de cellules leucémiques localisées dans la  
MO fémorale des souris secondaires**



**Figure 28** : Migration dans la MO fémorale des cellules leucémiques extraites des vertèbres thoraciques (en rouge) ou caudales (en bleu) injectées par voie sanguine dans des souris secondaires.  $1.10^6$  cellules leucémiques sont injectées en souris secondaires. Est représenté le nombre absolu de cellules leucémiques comptées dans les deux fémurs des souris secondaires 16 heures après l'injection. 4 LAL-T ont été utilisées (#1 : rond, #2 : triangle inversé, #16 : carré, #3 : triangle). 2 à 3 souris ont été injectées par conditions selon le nombre de cellules leucémiques disponibles. Test statistique : Wilcoxon test. \* :  $p < 0,05$ .

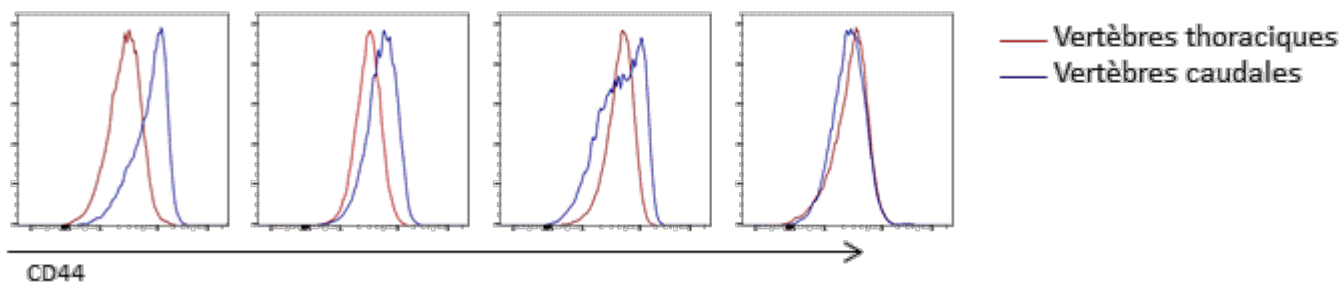
résultat s'accorde avec la diminution d'expression du CXCR4 à la surface des cellules leucémiques des vertèbres caudales comparées aux vertèbres thoraciques.

### III.2. Analyse de la capacité de migration vers la MO fémorale des cellules leucémiques originaires des deux territoires médullaires.

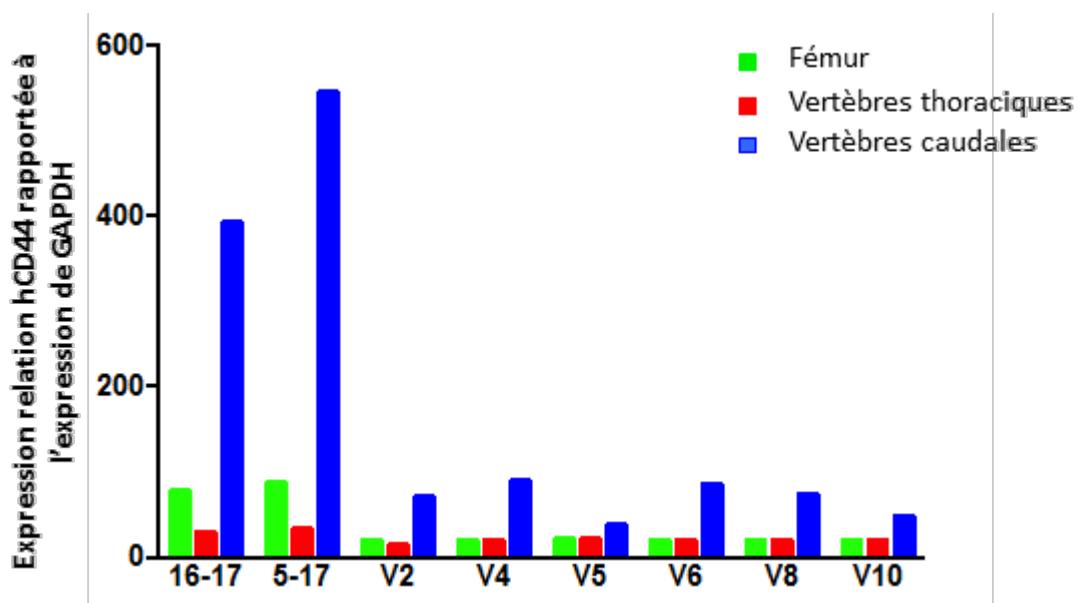
La migration *in vivo* est un mécanisme qui fait intervenir de nombreux axes moléculaires dont certains sont impliqués dans le chimiotactisme. La voie de prédilection de la migration des cellules leucémiques de LAL-T vers la MO étant la voie CXCR4/CXCL12 (Pitt et al., 2015), et au regard des résultats de migration CXCL12 dépendante obtenus *in vitro*, nous avons testé *in vivo* la capacité des cellules leucémiques à migrer vers l'un des tissus les plus sécréteurs de CXCL12, la MO. Pour cela, les cellules leucémiques issues des vertèbres thoraciques ou caudales de souris préalablement transplantées avec des échantillons de LAL-T ont été injectées dans des souris secondaires à raison de  $1.10^6$  cellules/souris par la voie veineuse. Les souris secondaires ont été sacrifiées 16 heures plus tard et la migration dans la MO fémorale a été analysée en comptant le nombre de cellules leucémiques humaines CD45<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup> détectables à cet instant par cytométrie de flux. Comme mentionné dans l'article, les souris sont exsanguinées afin de minimiser la contamination du dénombrement par les cellules leucémiques circulantes. Ce temps précis permet d'évaluer strictement la migration en excluant un différentiel de prolifération.

Ce potentiel de migration vers la MO a été analysé en utilisant 4 échantillons de LAL-T (#1, #2, #16 et #3). Sur un total de  $1.10^6$  cellules leucémiques injectées, issues des vertèbres thoraciques et des vertèbres caudales, entre 200 et 4000 cellules leucémiques ont été dénombrées dans la MO des deux fémurs des souris secondaires, soit entre 0.02 et 0.4% du nombre de cellules injectées (**Figure 28**). De façon inattendue, nous avons observé que pour 3/4 LAL-T utilisées, les cellules leucémiques issues des vertèbres caudales sont 2 à 3 fois plus nombreuses dans la MO fémorale des souris secondaires que les cellules leucémiques provenant des vertèbres thoraciques. Ce résultat est surprenant si on considère que les cellules leucémiques originaires des vertèbres caudales expriment des taux plus faibles de CXCR4 de surface que celles des vertèbres du thorax et que l'axe CXCR4/CXCL12 est majeur pour la migration et la survie des LAL-T (Passaro et al., 2015; Pitt et al., 2015).

Ces résultats indiquent que l'implantation de cellules de LAL-T dans la MO fémorale ne dépend pas de la présence de taux élevés de CXCR4 contrairement à la migration observée *in vitro* en chambre de Boyden en présence d'un gradient de CXCL12. Il serait intéressant de



**Figure 29** : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de CD44 à la surface des cellules leucémiques des LAL-T #1, #2, #16 et #3 isolées à partir des vertèbres thoraciques et des vertèbres caudales.



**Figure 30** : Quantification relative de l'expression des transcrits *CD44* rapportée à l'expression du transcrite de ménage (*GAPDH*) en RT-PCR quantitative. Le couple de primers 16-17 permet de détecter l'ensemble des variants hCD44, le couple 5-17 uniquement la forme standard hCD44s et les autres couples détectent différents hCD44v. Résultat obtenu avec la LAL-T #10 représentatif des résultats obtenus avec 5 LAL-T différentes. Sont représentés en vert l'expression relative du hCD44 des cellules leucémiques issues des fémurs, en rouge des vertèbres thoraciques et en bleu des vertèbres caudales.

traiter les cellules leucémiques des deux sites avant leur injection *in vivo* afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de CXCR4 sur le homing dans la MO fémorale.

#### IV. Rôle de l'expression de CD44 par les cellules leucémiques de LAL-T.

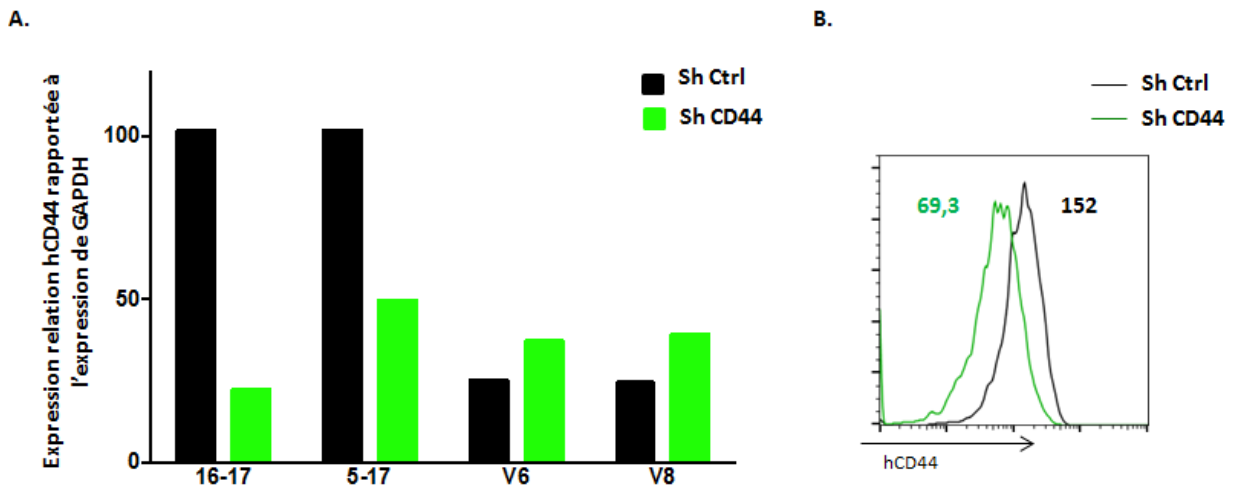
L'analyse phénotypique des cellules originaires des deux territoires médullaires montre une variation d'expression de nombreux récepteurs impliqués dans l'adhésion et la migration (Figure 2B de (Cahu et al., 2017)). Cette analyse non exhaustive, montre une augmentation d'expression de surface de CD44, récepteur entre autre de l'ostéopontine, dans les vertèbres caudales par rapport aux vertèbres thoraciques. Ainsi les 3 LAL-T (LAL-T #1, #2 et #16) des MO caudales à fort potentiel de migration dans la MO fémorale avaient une expression de CD44 augmentée en comparaison aux vertèbres du thorax (**Figure 29**). Par contre, l'échantillon (LAL-T #3) ayant une capacité similaire à migrer vers la MO fémorale en souris secondaires qu'elle ait été extraite des vertèbres caudales ou thoraciques (**Figure 28**) présentait la particularité d'avoir des taux d'expression de CD44 identiques entre les deux sites médullaires analysés (**Figure 29**). Ces résultats sont en faveur d'une corrélation entre un fort pouvoir migratoire et une augmentation de CD44.

##### IV.1. Analyse de l'expression des variants de CD44 dans les LAL-T.

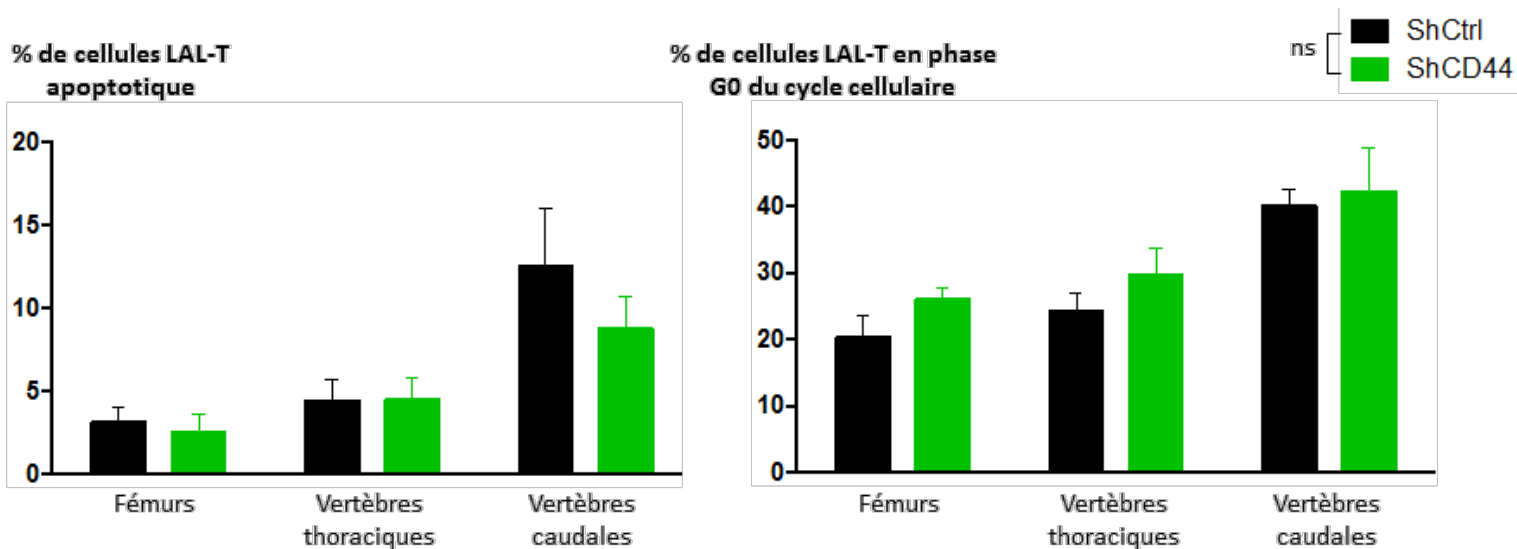
Nous avons vu dans l'Introduction du manuscrit (paragraphe II.1.a) qu'un grand nombre de variants de CD44 sont générés grâce à l'épissage alternatif de l'ARNm. Afin de déterminer si l'augmentation de CD44 en surface des LAL-T issues de la MO caudale était due à un mécanisme transcriptionnel, nous avons tout d'abord analysé quel(s) variant(s) de CD44 est/sont exprimé(s). La présence dans les cellules leucémiques issues des deux territoires médullaires des ARNm des différents variants de CD44 a été testée par RT-PCR quantitative (pour Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction). Nous avons utilisé des primers qui s'hybrident sur les différents exons de *CD44* afin de discriminer l'ensemble des variants d'ARNm présents dans la cellule. L'analyse effectuée sur 5 échantillons de LAL-T (#1, #10, #15, #16, #17) a permis de montrer que seule la forme standard (*CD44s*) est exprimée par les LAL-T étudiées (**Figure 30**). De plus, nous avons constaté que le variant *CD44s* est le seul dont l'expression est augmentée dans les cellules leucémiques isolées des vertèbres caudales (**Figure 30**).

Puisque la forme *CD44s* peut être impliquée dans la progression tumorale (Zöller, 2015), nous avons testé si l'augmentation d'expression de cette protéine est responsable des différents phénotypes observés dans les cellules leucémiques des vertèbres caudales.





**Figure 31 :** Diminution d'expressions de CD44 (transcrits et protéine) dans les cellules leucémiques de la LAL-T #1 obtenue par l'utilisation d'un vecteur lentiviral codant un ARNi dirigé contre une séquence constante hCD44 (Sh CD44). **A.** Expression relative des différents transcrits de CD44 (total, standard et variants) des cellules leucémiques ShCtrl et ShCD44. **B.** Expression protéique CD44 à la surface des cellules leucémiques analysée par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps pan-CD44. Les moyennes d'intensités de fluorescence sont représentées dans la figure. Un résultat identique a été obtenu avec la LAL-T #16.



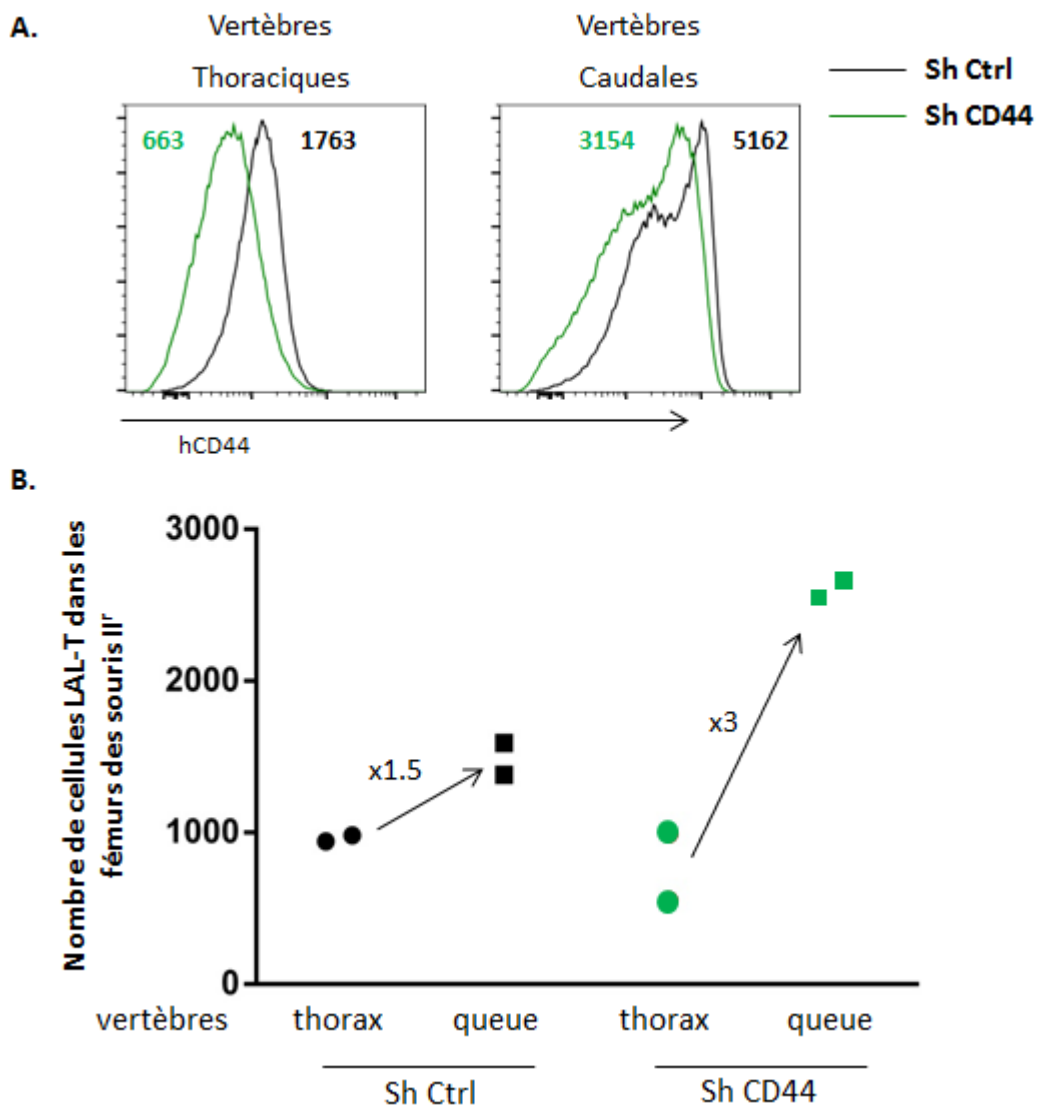
**Figure 32 :** Analyse du pourcentage de cellules leucémiques en apoptose (à gauche) et en phase G0 du cycle cellulaire (à droite) en fonction du territoire médullaire en condition de perte ou pas de fonction de CD44 (ShCtrl et ShCD44). Ces résultats obtenus avec la LAL-T #1 sont représentatifs des résultats obtenus avec 3 LAL-T pour l'analyse de l'apoptose (#1, #15 et #16) et 2 LAL-T pour le cycle cellulaire (#1 et #15). Les cellules apoptotiques sont mesurées par cytométrie en flux avec un marquage à l'Annexine V. Les cellules apoptotiques sont Annexine V<sup>+</sup>. La proportion des cellules leucémiques en phase G0 du cycle cellulaire est évaluée par marquage intracellulaire avec du Ki67 et du Hoescht. Les cellules en phase G0 du cycle cellulaire sont Ki67<sup>+</sup>. Test statistique : Bonferroni's multiple comparisons test. ns : non significatif.

#### IV.2. Rôle de l'augmentation d'expression de CD44s à la surface des cellules leucémiques des vertèbres caudales.

Afin de déterminer l'implication de l'augmentation d'expression de CD44 à la surface des cellules leucémiques dans les vertèbres caudales, nous avons diminué l'expression de la protéine grâce à un vecteur lentiviral codant un ARN interférant dirigé contre une séquence d'un exon constant de l'ARNm CD44. Comparées aux cellules leucémiques transduites par le vecteur contrôle (nommé ShCtrl ; pour Short Hairpin RNA), les cellules transduites avec le vecteur d'intérêt (nommé ShCD44) permet une diminution d'expression de l'ARNm CD44 supérieure à 50% (**Figure 31A**). Cette diminution d'expression du transcrite standard n'est pas compensée par l'expression intensifiée des autres différents variants (**Figure 31A**). De façon cohérente avec la quantité de transcrits retrouvée dans les cellules leucémiques transduites avec le ShCD44, l'expression à la surface des cellules leucémiques de CD44 est également diminuée d'environ 50% (**Figure 31B**).

Afin de tester l'effet fonctionnel de la diminution d'expression de CD44, les cellules leucémiques de la LAL-T #1 transduites par les vecteurs ShCtrl et ShCD44 ont été transplantées par voie intra-veineuse dans des souris NSG. Lorsque les souris présentaient une prise de greffe  $\geq 90\%$  dans la MO fémorale, nous les avons sacrifiées puis mesuré le taux de cellules leucémiques dans les différents sites médullaires. Les résultats montrent que la diminution d'expression du CD44 à la surface des cellules leucémiques n'a pas impacté le pourcentage d'infiltration des vertèbres caudales comparé à la condition ShCtrl ( $>80\%$  d'infiltration quelque soit la condition). Dans un second temps, nous avons mesuré l'impact du niveau de CD44 sur la biologie des LAL-T récupérées à partir des sites de MO étudiés. Nous avons constaté que les proportions des cellules en apoptose et en phase G0 du cycle cellulaire dans les différents territoires médullaires ne diffèrent pas entre les conditions ShCtrl et ShCD44 (**Figure 32**). Ces résultats indiquent que la diminution d'expression de CD44 de surface n'entrave ni l'infiltration, ni les réponses cellulaires (progression dans le cycle cellulaire et entrée en apoptose) des cellules leucémiques dans les différents territoires médullaires étudiés.

L'ostéopontine a un pouvoir chimioattractant de cellules exprimant son récepteur CD44 (Zöller, 2015). Afin de savoir si l'augmentation d'expression de CD44 à la surface des cellules leucémiques des vertèbres caudales participait à l'augmentation de migration vers la MO fémorale après transplantation en souris secondaires, nous avons effectué la même expérience de migration *in vivo* que précédemment mais avec des cellules leucémiques ShCtrl et ShCD44. Les cellules leucémiques de la LAL-T #1 exprimant un ShCtrl et un ShCD44 ont



**Figure 33:** Suivi de la migration de cellules de LAL-T #1 ShCtrl et ShCD44 extraites des vertèbres thoraciques et caudales vers la MO fémorale. **A.** Analyse de la diminution d'expression de surface CD44 pour les cellules extraites des vertèbres thoraciques et caudales. Sont montrés les résultats représentatifs d'une souris primaire. Sont indiqués les moyennes de fluorescence obtenues pour chaque condition **B.** Migration dans la MO fémorale des cellules leucémiques extraites des vertèbres thoraciques ou caudales injectées par voie sanguine dans des souris secondaires. ShCtrl en noir et ShCD44 en vert.

été triées sur la base de l'expression de la GFP (marqueur intrinsèque aux deux constructions lentivirales qui permet la mesure de l'efficacité de transduction). Les cellules ShCtrl/GFP<sup>+</sup> et ShCD44/GFP<sup>+</sup> ont été injectées en souris primaires où elles se sont implantées pendant plusieurs semaines. Les cellules issues des vertèbres thoraciques et caudales ont été isolées lorsque l'invasion leucémique était  $\geq 90\%$  dans la MO fémorale. Dans tous les cas, les cellules leucémiques ShCD44/GFP<sup>+</sup> exprimaient CD44 à un niveau plus faible que les cellules shCtrl/GFP<sup>+</sup> (**Figure 33A**).

Les cellules leucémiques isolées à partir des deux sites de MO ont été injectées en souris NSG secondaires et leur capacité de migration vers la MO fémorale a été mesurée 16 heures plus tard. Les résultats obtenus avec les cellules leucémiques ShCtrl/GFP<sup>+</sup> confirment les expériences précédentes, à savoir une meilleure capacité de migration des cellules originaires des vertèbres caudales comparées aux vertèbres thoraciques (x1,5) (**Figure 33B**). Des résultats similaires ont été observés avec les cellules leucémiques exprimant moins de CD44 à leur surface, à savoir une augmentation du nombre de cellules leucémiques détectées dans la MO fémorale lorsque les LAL-T avaient été isolées des vertèbres caudales (x3 par rapport aux vertèbres thoraciques; **Figure 33B**). Il est à noter que dans cette expérience, la diminution d'expression de CD44 à la surface des cellules leucémiques des vertèbres caudales n'était pas suffisante pour obtenir un niveau d'expression comparable à celle des vertèbres thoraciques (**Figure 33A**). Il sera important de reproduire cette expérience en diminuant plus fortement l'expression de CD44 afin de pouvoir conclure sur l'impact de l'augmentation d'expression de CD44 à la surface des cellules leucémiques des vertèbres caudales.



- Vertèbre broyée, cellules leucémiques dénombrées
- Vertèbre implantée en souris secondaire

**Figure 34** : Représentation schématique de l'analyse des souris primaires. En rouge sont représentées les vertèbres broyées pour lesquelles sont phénotypées et dénombrées les cellules leucémiques et en bleu les vertèbres qui ont été implantées en souris II<sup>r</sup> par la voie sous-cutanée.

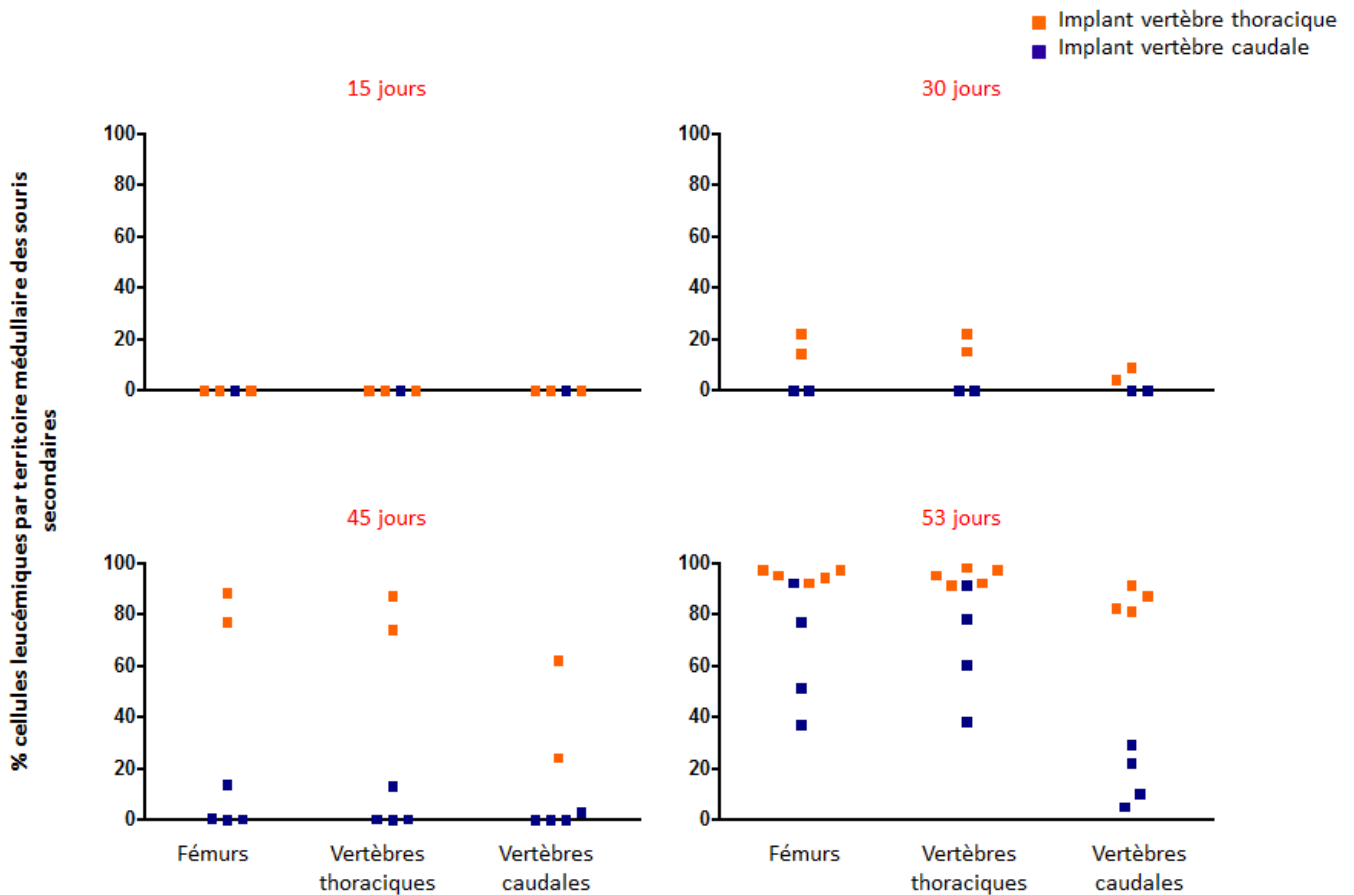
## V. Mise en place d'un modèle d'étude de la migration leucémique *in vivo* hors des MO d'intérêts.

La question initialement posée était de savoir s'il est possible de déloger les cellules leucémiques des vertèbres caudales qui représentent un sanctuaire inductible de chimiorésistance afin de les rendre plus sensibles aux traitements. Notre première stratégie a consisté à jouer sur des voies moléculaires importantes dans l'implantation des cellules leucémiques dans la MO des souris où l'ensemble des sites médullaires d'intérêt étaient infiltrés. Cette approche nous permettait dans une même souris de suivre la mobilisation de chaque site en comparaison aux autres. Le souci dans cette stratégie était que s'il y avait mobilisation, nous ne saurions pas de quel site médullaire provenaient les cellules mobilisées et donc il serait compliqué de mesurer de quelle manière la mobilisation touchait les cellules de la MO des vertèbres caudales dont l'infiltration est moindre.

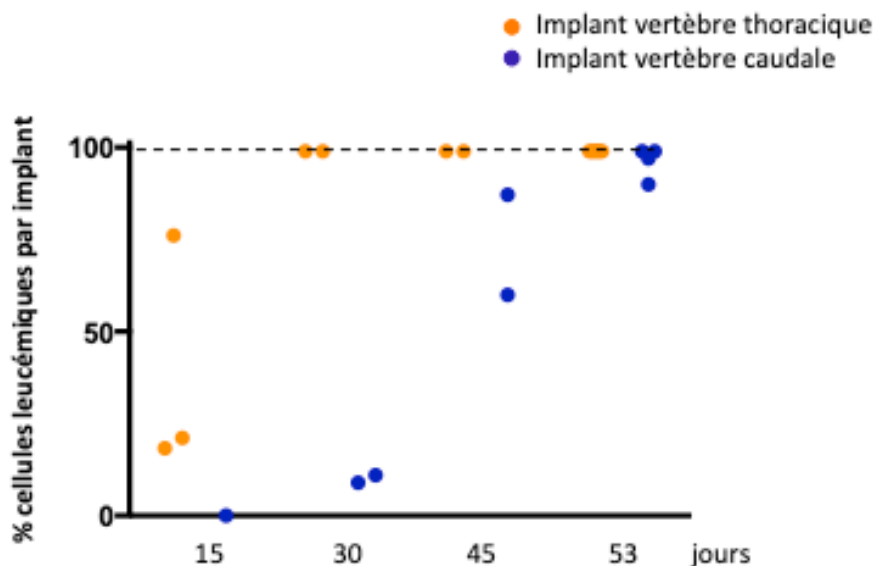
Dans une seconde stratégie, nous avons isolé des vertèbres thoraciques et caudales préalablement infiltrées par des cellules leucémiques de souris primaires que nous avons implantées sous la peau de souris secondaires dépourvues de toute leucémie. Ainsi, la diffusion des cellules leucémiques dans la souris secondaire aurait uniquement pour origine la pièce anatomique (vertèbres thoraciques ou caudales) implantée. Il était même possible d'envisager d'implanter des vertèbres différentes sur chaque souris et de distinguer préalablement les cellules implantées en les marquant avec des colorants fluorescents distincts, comme le CFSE et le PKH26, afin de suivre la mobilisation de chaque site dans une même condition.

Pour tester cette approche, cinq souris « primaires » préalablement transplantées avec des cellules leucémiques de LAL-T #1 ont été sacrifiées lorsqu'elles présentaient une infiltration  $\geq 90\%$  de cellules leucémiques dans la MO fémorale. Cinq vertèbres thoraciques et caudales ont été récupérées et 3 d'entre elles ont été broyées puis analysées en cytométrie en flux afin de mesurer leur degré d'infiltration leucémique (**Figure 34**). Les vertèbres thoraciques et caudales non broyées ont été implantées en sous-cutané à des souris secondaires. Puisque les adipocytes médullaires des vertèbres caudales inhibent la vascularisation (Zhou et al., 2017), nous avons imprégné les implants osseux dans du Matrigel® afin de favoriser la néo-vascularisation de la pièce anatomique greffée. Chaque souris secondaire a reçu deux vertèbres et un total de 9 souris ont été transplantées avec des vertèbres thoraciques et 10 souris avec des vertèbres caudales. Une cinétique de sacrifice des souris secondaires a été effectuée afin de suivre l'évolution de l'infiltration leucémique de ces





**Figure 35** : Cinétique de prise de greffe des cellules leucémiques la LAL-T #1 dans les différents territoires médullaires (Fémurs, vertèbres thoraciques et caudales) des souris secondaires en fonction du type d'implants greffés. En orange sont représentées les souris transplantées avec deux vertèbres thoraciques des souris primaires. En bleu sont représentées les souris transplantées avec deux vertèbres caudales des souris primaires.



**Figure 36** : Infiltrat leucémique des implants par les cellules de la LAL-T #1 mesuré lors du sacrifice des souris secondaires. En orange sont représentés les implants vertèbres thoraciques et en bleu les implants vertèbres caudales. La barre pointillée correspond à l'infiltration des vertèbres analysées avant la greffe en sous-cutanée des autres vertèbres isolées (Figure 34) dans les souris secondaires.

greffons et comment ces cellules se propagent dans les autres sites de MO des souris secondaires.

A 15 jours post implantation, nous avons observé que les souris secondaires ne présentent aucune cellule leucémique dans les MO fémorale, thoracique et caudale. A 30 jours, seules les souris secondaires transplantées avec les vertèbres thoraciques présentent un début d'infiltration leucémique dans les MO fémorale et thoracique. Le résultat du sacrifice à 45 jours confirme les résultats obtenus à 30 jours avec une infiltration leucémique des souris implantées avec les vertèbres thoraciques se situant entre 20-80% selon le site de MO étudié. 8 jours plus tard, les souris implantées avec les vertèbres thoraciques ont une infiltration leucémique maximale de  $\geq 90\%$  dans tous les sites de MO étudiés. En comparaison, les souris greffées avec des vertèbres caudales montrent un retard important de l'envahissement leucémique quel que soit le temps d'analyse et le site médullaire étudié (**Figure 35**). Ces résultats sont somme toute indicatifs d'une moindre agressivité des cellules leucémiques des vertèbres caudales.

Il est à noter que les vertèbres thoraciques et caudales avant implantation étaient initialement infiltrées à plus de 90% par les cellules leucémiques. L'analyse du degré d'infiltration des implants au moment du sacrifice des souris secondaires montre une infiltration  $\geq 90\%$  au temps de sacrifice le plus tardif (53 jours) des souris secondaires (**Figure 36**). Toutefois ce chiffre diminue drastiquement au plus on se rapproche du jour de l'implantation, ce qui indique une perte importante de la charge leucémique en post-implantation, sans doute en lien avec une vascularisation lente et donc un stress important dans l'implant.

Ce modèle ne peut donc pas servir comme outil permettant l'analyse de la migration des cellules leucémiques hors du territoire médullaire implanté. Par définition, l'emplacement anatomique des vertèbres thoraciques et caudales est différent. La température peut tout à faire varier entre les vertèbres thoraciques et caudales. Ainsi, notre modèle permet de s'affranchir de ce concept puisque les implants sont localisés au même endroit anatomique de la souris.

## Discussion et Perspectives

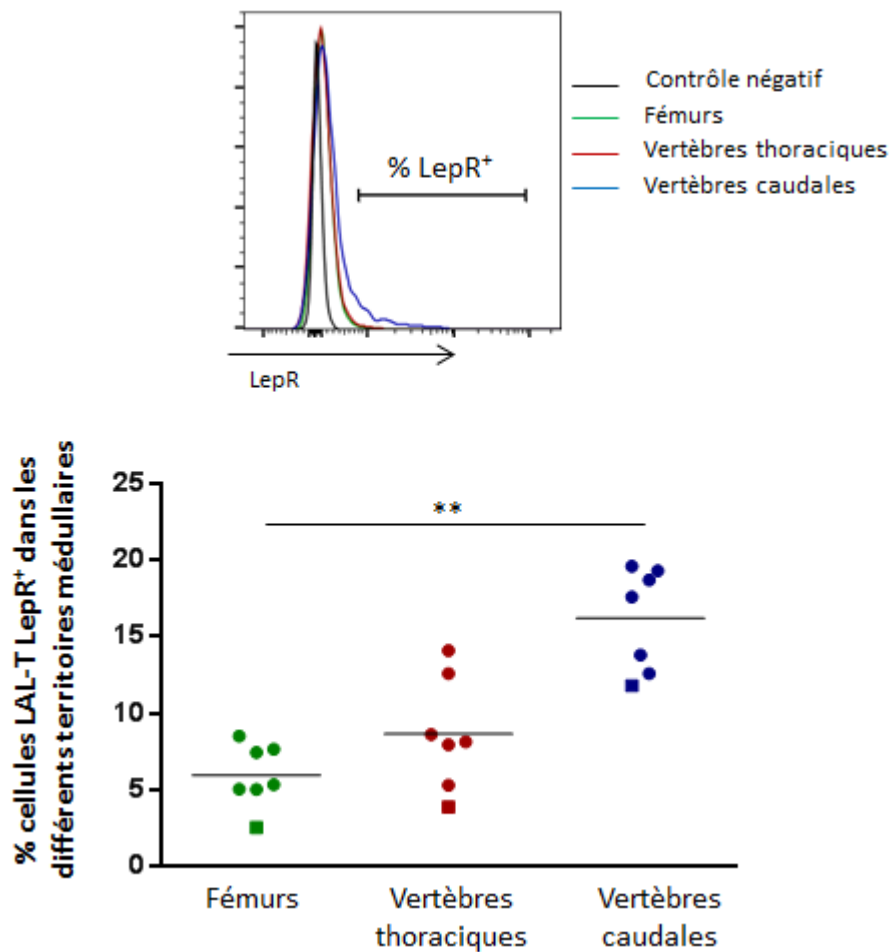
---

Au cours de ma thèse je me suis intéressé à caractériser l'interaction entre les cellules leucémiques de LAL-T et le tissu adipeux médullaire. Pour ce faire, nous avons transplanté les cellules leucémiques de prélèvements pédiatriques de LAL-T dans des souris immunodéficientes qui présentent un gradient cranio-caudale d'adipocytes dans la colonne vertébrale (Naveiras et al., 2009). Ainsi la MO des vertèbres thoraciques est pauvre en adipocytes et riche en hématopoïèse contrairement à la MO des vertèbres caudales qui est riche en adipocytes et pauvres en tissu hématopoïétique. La transplantation des cellules de LAL-T dans ces souris immunodéficientes a permis de montrer que les cellules leucémiques étaient capables d'infiltrer les deux types de MO (pauvre et riche en adipocytes).

Comparées aux vertèbres thoraciques, les cellules leucémiques extraites des vertèbres caudales présentent une expression différente des marqueurs de surface, un métabolisme global ralenti (respiration mitochondriale et glycolyse) et une accumulation en phase G0 du cycle cellulaire entraînant ainsi une résistance face aux agents chimiothérapeutiques qui ciblent le cycle cellulaire. Confirmant l'importance du tissu adipeux, les cellules leucémiques extraites du tissu adipeux blanc des gonades ainsi que les co-cultures de ces cellules sur des cellules stromales différenciées en adipocytes récapitulent l'intégralité des phénotypes décrits *in vivo*.

Les analyses en CGH array (pour Comparative Genomic Hybridization) et en WES (pour Whole Exome Sequencing) montrent que les cellules leucémiques extraites des deux territoires conservent les mêmes modifications géniques excluant la sélection de sous-clone. De plus la capacité identique des cellules leucémiques extraites des deux territoires à initier la LAL-T en souris secondaire conforte l'absence de sélection clonale entre les deux territoires. Enfin nous avons montré que les cellules leucémiques issues des vertèbres caudales adoptaient très rapidement en culture *in vitro* les caractéristiques des cellules issues des vertèbres thoraciques. Ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle les phénotypes des cellules leucémiques obtenus dans les vertèbres caudale sont le fruit d'une plasticité cellulaire et non d'une sélection de sous-clone.

Dans la suite de ce chapitre je vais discuter des résultats obtenus au cours de ma thèse et introduire des nouvelles données qui j'ai placé délibérément dans cette partie afin d'en discuter.



**Figure 37 :** Expression de LepR à la surface des cellules leucémiques de LAL-T. Le panel du haut est un exemple d'expression de LepR à la surface des cellules leucémiques de la LAL-T #1 issues des différents territoires médullaires. Le panel du bas récapitule l'ensemble des pourcentage de cellules leucémiques exprimant LepR à la surface selon les différents sites analysés. Sont représentés 2 LAL-T (en carré : 1 souris greffée avec la LAL-T #15 ; en rond : 6 souris greffées avec la LAL-T #1). En vert les cellules issues des fémurs, en rouge des vertèbres thoraciques et en bleu des vertèbres caudales. Test statistique : Bonferroni's multiple comparisons test. \*\* :  $p < 0,01$ .

## I. Education des cellules leucémiques par le microenvironnement médullaire riche en adipocytes.

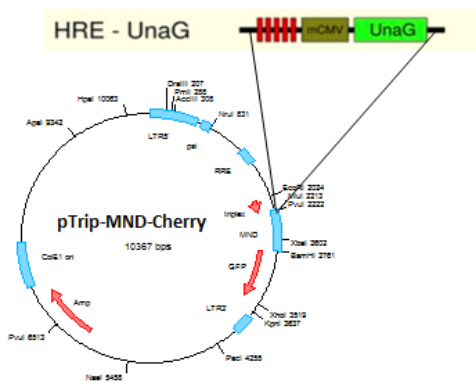
### I.1. Pertinence des adipocytokines dans les caractéristiques observées.

Comme mentionné dans l'introduction, les adipocytes peuvent altérer le devenir des cellules environnantes par la sécrétion d'adipocytokines. Il a d'ailleurs été rapporté que les cellules leucémiques du Myélome Multiple présentent un ralentissement de la progression dans le cycle cellulaire lorsqu'elles sont exposées *in vitro* à de l'adiponectine (Medina et al., 2014). D'un autre côté, la signalisation induite par la liaison du ligand Leptine à son récepteur est responsable de l'inhibition de l'apoptose induite par les agents chimio-thérapeutiques sur les cellules de LAM (Tabe et al., 2017) et est capable d'induire un arrêt de prolifération des cellules de lignées de LAL-T et B (Lu et al., 2017). Dans cette dernière publication, la diminution du taux de Leptine circulante induit une augmentation d'expression de son récepteur à la surface des cellules leucémiques. Comme décrit dans cet article, les LAL-T que j'ai étudiées n'expriment pas/peu de récepteur LepR à leur surface (**Figure 37**). L'immersion des cellules leucémiques de LAL-T dans l'environnement médullaire riche en adipocytes induit très faiblement son expression à leur surface (**Figure 37**). Dans l'article de Z. Lu, il est montré que l'activation de la signalisation induite par LepR aboutit à l'augmentation d'expression de PRDM1 qui est décrit comme régulateur clé de l'inhibition de la prolifération leucémique. Contrairement à ces résultats, la faible augmentation d'expression de LepR à la surface des cellules leucémiques issues des vertèbres caudales n'est pas accompagnée de l'induction de la transcription de *Prdm1* (résultat de l'analyse du transcriptome). Bien que nous n'ayons pas analysé la signalisation en aval de LepR, il semble que les caractéristiques des cellules de LAL-T observées dans les vertèbres caudales ne soient pas induites par la voie Leptine/LepR.

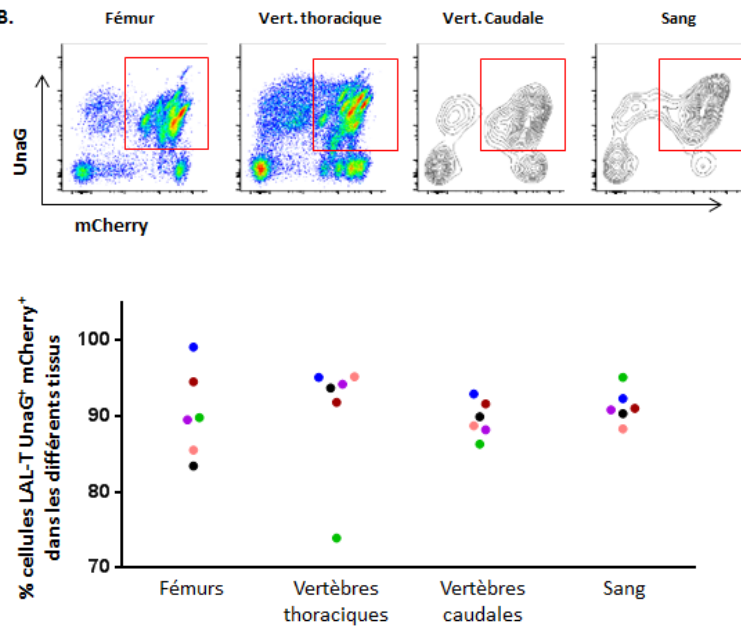
### I.2. Les environnements riches en adipocytes sont pauvres en concentration d'oxygène.

De nombreuses études rapportent que les tissus adipeux sont des territoires hypoxiques (Pasarica et al., 2009; Rausch et al., 2008; Trayhurn, 2014). D'autre part, il a été montré que la vascularisation des vertèbres caudales est négativement impactée par les adipocytes (Zhou et al., 2017). Partant de l'hypothèse que ce territoire présente un taux en O<sub>2</sub> globalement plus faible que la MO des vertèbres thoraciques, j'ai participé à l'étude de l'impact des faibles concentrations d'O<sub>2</sub> sur l'expansion/l'agressivité/la chimiorésistance *in vitro* des cellules de LAL-T. Les phénotypes observés dans cette étude menée dans le cadre de

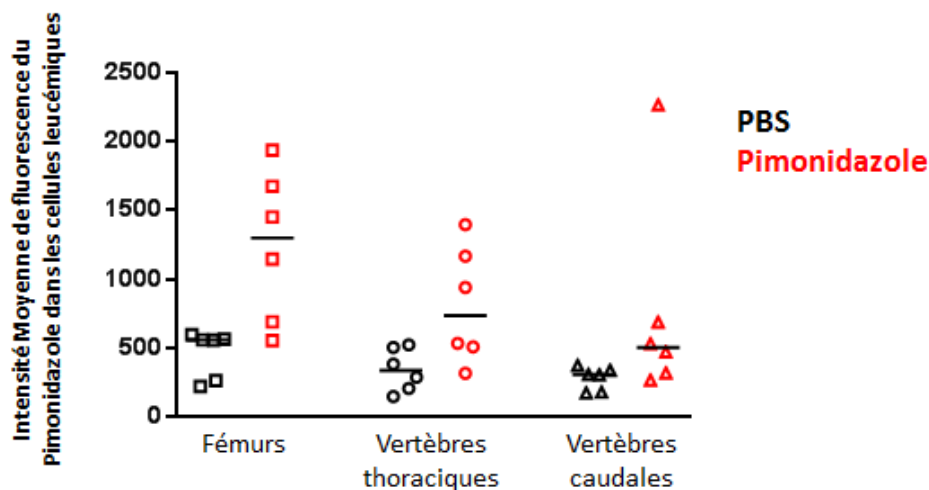
A.



B.



**Figure 38** : Analyse de l'expression de la protéine rapportrice fluorescente d'HIF-1 $\alpha$ . **A.** Stratégie de clonage du plasmide pTrip-HRE-CMV-UnaG-MND-mCherry permettant la production du lentivecteur d'intérêt. **B.** Les cellules leucémiques ont été transduites par ce vecteur, triées mCherry<sup>+</sup> puis transplantées en souris NSG. Quand les souris présentaient une prise de greffe médullaire >90%, les souris ont été sacrifiées et les cellules leucémiques extraites des différents sites. Le panel du haut correspond à un exemple d'analyse en cytométrie en flux de l'expression des protéines fluorescentes UnaG et mCherry des cellules de LAL-T #1 issues des différents sites. L'expression de la protéine fluorescente mCherry rend compte de l'efficacité de transduction (promoteur ubiquitaire MND). Le cadrant rouge indique les cellules mCherry<sup>+</sup>/UnaG<sup>+</sup> (transduites et pour lesquelles la protéine HIF-1 $\alpha$  est active). Le panel du bas récapitule le pourcentage de cellules leucémiques mCherry<sup>+</sup>/UnaG<sup>+</sup> retrouvées dans les différents sites pour 6 souris analysées.



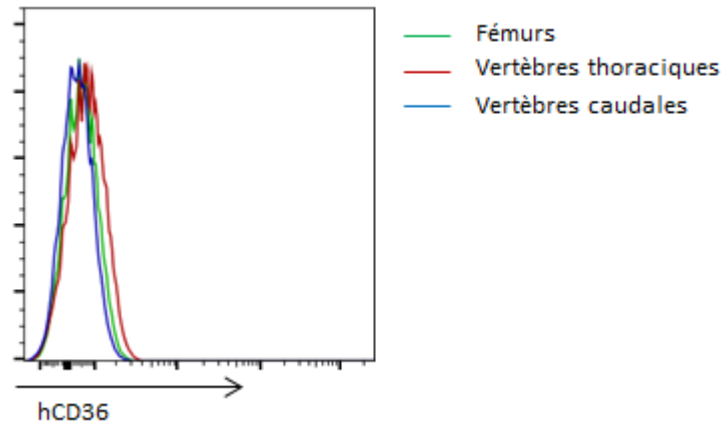
**Figure 39** : Analyse de la détection du Pimonidazole dans les cellules de LAL-T présentes dans les différents territoires médullaires. Le Pimonidazole a été injecté à 120 mg/kg en intra-péritonéale à des souris infiltrées par les cellules leucémiques de LAL-T #1 (>90% dans la MO fémorale). 2 heures après l'injection les souris ont été sacrifiées et les cellules leucémiques ont été extraites des différents territoires de MO. L'analyse de la fixation du Pimonidazole réduit dans les cellules leucémiques se fait après fixation et perméabilisation et marquage avec un anticorps anti-Pimonidazole couplé à la Phycoérythrine. L'intensité de fluorescence rend compte de l'intensité de fixation du Pimonidazole et donc de l'état hypoxique des cellules leucémiques. Test statistique : Bonferroni's multiple comparisons test. ns : non significatif.



la thèse de Lucine Fahy récapitulent ceux que nous observons dans les vertèbres caudales (**Annexe 1**). Toutefois l'analyse *in vivo* de la teneur en O<sub>2</sub> que j'ai menée avec plusieurs approches méthodologiques n'a pas permis de conforter cette hypothèse. En effet, l'analyse du transcriptome n'a pas révélé de signature spécifique de l'hypoxie dans les cellules leucémiques des vertèbres caudales. Parallèlement, j'ai développé et utilisé un vecteur lentiviral qui permet l'expression d'une protéine fluorescente (UnaG) de façon dépendante à la stabilisation du facteur HIF-1 $\alpha$  (Erapaneedi et al., 2016). Après validation de cet outil *in vitro* sur une lignée cellulaire cultivée en hypoxie (**Figure 38A**), j'ai utilisé cette construction dans des cellules leucémiques de patients, greffées à des souris NSG. L'analyse des cellules greffées a montré qu'un % important des cellules exprimait le transgène UnaG HIF-1 $\alpha$ -dépendant quel que soit le site de MO considéré, indiquant que ce marqueur de l'hypoxie est activé. Toutefois, peu de différence ont été révélées entre les différents sites pour plusieurs souris analysées (**Figure 38B**). Enfin, nous avons utilisé le Pimonidazole, agent chimique qui est réduit dans un environnement hypoxique. Une fois réduit, il se lie de façon irréversible aux groupements thiol des protéines ce qui permet de détecter des cellules hypoxiques en cytométrie en flux grâce à un anticorps anti-Pimonidazole couplé à un fluorochrome. L'utilisation *in vivo* de Pimonidazole n'a pas montré de différence d'intensité de marquage entre les cellules issues des fémurs des vertèbres thoraciques. Les cellules leucémiques issues des vertèbres caudales étaient quant à elles très peu marquées par le Pimonidazole (**Figure 39**). Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer ce phénomène : soit les cellules leucémiques des vertèbres caudales sont dans un environnement hyperoxique ne permettant pas la réduction du Pimonidazole, soit la molécule n'a pas pu être incorporée par les cellules leucémiques à cause d'une mauvaise distribution dans ce site. Cette deuxième hypothèse est appuyée par le fait que les vertèbres caudales présentent une vascularisation bien moins importante que celle des autres territoires médullaires (Zhou et al., 2017). Il est aussi possible que les cellules adipocytaires stockent le Pimonidazole et restreignent son accessibilité aux cellules leucémiques.

Nous pouvons penser également que l'ensemble des outils que nous avons utilisés ne sont pas assez sensibles pour rendre compte d'une faible variation de concentration d'O<sub>2</sub>.

Bien que ces résultats ne permettent pas de montrer que la MO adipocytaire des vertèbres caudales présente une concentration plus faible en O<sub>2</sub> que la MO non adipocytaire, nous pensons que la question reste ouverte et que pour y répondre, il faut trouver un outil plus adapté que ceux utilisés précédemment.



**Figure 40** : Expression de CD36 à la surface de cellules de LAL-T issues des différents territoires médullaires. Résultat obtenu en cytométrie en flux avec les cellules de LAL-T #1 extraites d'une souris (représentatif des résultats obtenus avec 4 souris). Résultat identique obtenu avec deux autres LAL-T (#3 : 1 souris et #5 : 2 souris).

### I.3. Modification métabolique des cellules leucémiques.

Comme exposé dans l'introduction, il a été montré que les adipocytes constituent une source énergétique pour les cellules cancéreuses grâce à la sécrétion d'acides gras. Le transporteur essentiel des acides gras est le CD36. Des études montrent que les cellules leucémiques de LMC, LAM et LLC sont métaboliquement dépendantes des acides gras libérés par les adipocytes par l'intermédiaire du transporteur CD36 (Rozovski et al., 2018; Ye et al., 2016). Dans l'étude menée avec les cellules de LAM et LMC, l'assimilation des acides gras permise par CD36 entraîne une diminution de la masse mitochondriale ainsi qu'une accumulation des cellules en phase G0 du cycle cellulaire (Ye et al., 2016). Ces phénomènes biologiques rappellent pour beaucoup ceux que nous observons dans les cellules leucémiques issues des vertèbres caudales. Que les cellules leucémiques de LAL-T proviennent des vertèbres thoraciques ou caudales, j'ai constaté que CD36 n'est pas exprimé en surface (**Figure 40**). Il semble donc que l'éducation des cellules leucémiques ne soit pas le résultat d'un switch métabolique de la glycolyse (intense dans les vertèbres thoraciques) vers l'assimilation des acides gras permise par le CD36, comme c'est le cas des cellules de LMC, LAM et LLC.

L'accumulation des cellules de LAL-T en phase G0 du cycle cellulaire est peut-être le facteur responsable du ralentissement global du métabolisme de ces cellules. Il est aujourd'hui bien établi que ces paramètres sont étroitement liés. Il paraît important de quantifier la concentration de glucose dans le broyat de vertèbres caudales comparée aux vertèbres thoraciques au regard de la diminution de la glycolyse des cellules leucémiques dans la MO adipocytaire. Enfin la diminution d'activité mitochondriale observée dans ce territoire riche en adipocytes peut être également le fruit d'un environnement pauvre en concentration d'O<sub>2</sub> perturbant de ce fait la progression des cellules leucémiques dans le cycle cellulaire.

Mesurer les différentes sources métaboliques et comprendre au mieux le métabolisme permettra peut-être de restaurer la progression du cycle cellulaire et de sensibiliser ainsi les cellules leucémiques des vertèbres caudales aux agents chimiothérapeutiques.

### I.4. Impact de la modification des marqueurs de surface.

#### I.4.a. Niveau d'expression et fonction de CXCR4.

Les cellules leucémiques de LAL-T sont largement dépendantes de l'interaction de CXCR4 à son ligand CXCL12. En effet, le groupe de J. Ghysdael a montré que la diminution d'expression de CXCR4 à la surface des cellules leucémiques entraîne une diminution de

survie de ces cellules (Passaro et al., 2015). D'autre part, ce même groupe et celui de I. Aifantis ont montré que la migration des cellules leucémiques dans la MO des souris est largement dépendante du pouvoir chimioattractant de CXCL12 vis à vis de son récepteur CXCR4 (Passaro et al., 2015; Pitt et al., 2015). Abolir la sécrétion par les cellules endothéliales de CXCL12 entraîne une altération complète de la migration des cellules leucémiques de LAL-T dans la MO (Pitt et al., 2015). Dans notre étude nous observons que les cellules leucémiques isolées des MO des vertèbres caudales présentent une diminution d'expression de CXCR4 à leur surface. Nous montrons que cette diminution d'expression de CXCR4 ne se traduit pas par une altération de la capacité à initier la leucémie puisque la fréquence de CILs (Cellules Initiatrices de Leucémies) est identique entre les deux territoires médullaires (Cahu et al., 2017). Bien que cette inhibition d'expression s'accompagne d'une diminution de migration dépendante au CXCL12 (**Figure 27**), les expériences de migration vers la MO montrent à l'inverse une augmentation de la capacité des cellules leucémiques extraites de la MO caudale à coloniser la MO fémorale de souris secondaires (**Figure 28**). Ces deux expériences ont été menées avec seulement 1 LAL-T commune et 2 LAL-T différentes. Pour conclure d'un effet global, il est impératif de confirmer ces données avec plusieurs LAL-T communes.

Dans notre étude, les cellules leucémiques répondent aux conditions créées dans la MO adipocytaire en rentrant en quiescence, en augmentant légèrement leur apoptose et en diminuant globalement l'ensemble des marqueurs de surfaces impliqués ou non dans l'adhésion cellulaire. Ce contexte particulier explique à mon sens la différence de phénotype observé avec les autres études au cours desquelles les cellules leucémiques ne sont pas altérées excepté pour l'expression de CXCR4.

De façon intéressante, de nombreux facteurs solubles autres que CXCL12 régulent la rétention et la quiescence des cellules souches hématopoïétiques tel que l'Angiopoïétine 1, le Stem Cell Factor, la Thrombopoïétine, la Fibronectine et l'Ostéopontine. Pour chaque facteur soluble, les cellules souches hématopoïétiques expriment des récepteurs (De Grandis et al., 2016; Wilkinson et al., 2019). Certains de ces récepteurs sont d'ailleurs exprimés à la surface des cellules leucémiques et l'on peut penser que dans ce contexte de quiescence, la cellule leucémique sur-exprime l'un d'entre eux essentiel à sa maintenance dans la niche.

Puisque les cellules leucémiques des vertèbres caudales expriment moins de CXCR4 à leur surface, nous avons émis l'hypothèse que leur mobilisation suite à l'injection de l'antagoniste chimique AMD 3100 serait plus aisée que les cellules leucémiques exprimant

fortement le récepteur à leur surface. En pratique les cellules seraient plus sensibles à l'AMD 3100 et en auraient besoin de moins pour la même mobilisation. Le but de cette expérience était de délocaliser les cellules leucémiques des vertèbres caudales afin de les rendre disponibles et sensibles aux agents chimio-thérapeutiques. Nos expériences ont montré que l'injection d'AMD 3100 en sous-cutanée ou par voie intra-veineuse permet bien d'induire une mobilisation massive de cellules de LAL-T dans la circulation sanguine comme cela a été précédemment décrit pour les CSHs et les LAL-B (Broxmeyer et al., 2005; Juarez et al., 2007). Cependant, malgré cette mobilisation importante des cellules leucémiques dans la circulation sanguine, nous n'avons pas vu de diminution drastique du nombre de cellules de LAL-T retrouvées dans la MO de chaque territoire analysé. Il est probable que la mobilisation importante est le fruit d'une mobilisation généralisée à partir de plusieurs sites, chacun produisant des quantités de cellules importantes mais qui ne changent pas significativement le nombre absolu de cellules leucémiques de chaque site. Comme les organes sécréteurs de CXCL12 et connus pour être infiltrés par les cellules leucémiques sont divers (Cojoc et al., 2013), il est attendu finalement que la mobilisation est le résultat d'une « délocalisation » non spécifique à la MO. Etudier spécifiquement la/les voies d'ancrage des cellules leucémiques à la MO adipocytaire est essentiel comme piste thérapeutique. Déloger les cellules leucémiques de la MO riche en adipocytes serait une alternative à la remise en division cellulaire au sein de la MO adipocytes. D'autre part, l'injection de l'AMD 3100 a eu un effet toxique pour les souris. La mobilisation des cellules leucémiques dans la circulation sanguine a entraîné la prostration des souris NSG (signe de souffrance). Ainsi réaliser cette même expérience dans un contexte où l'infiltration des MO est plus faible (par exemple suite à une poly-chimiothérapie) pourrait 1) générer moins de souffrance pour l'animal et 2) révéler des diminutions d'infiltrations visibles dans les sites médullaires étudiés.

#### I.4.b. Niveau d'expression et étude de CD44

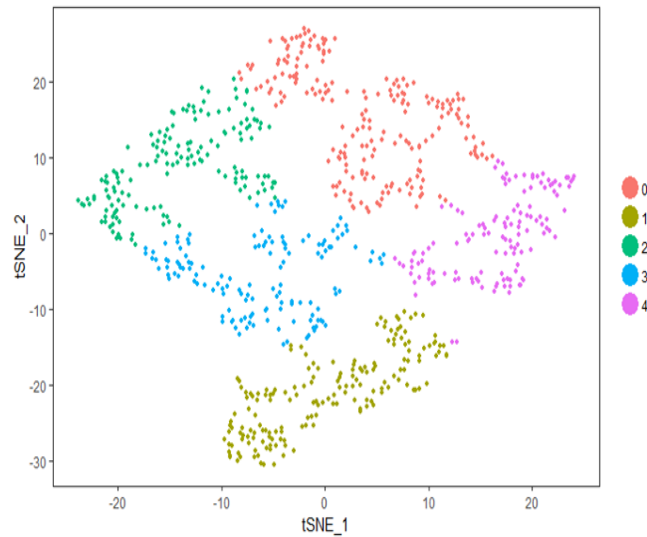
L'expression du récepteur CD44 varie au cours de la différenciation lymphocytaire T. Cela permet d'ailleurs de distinguer certains stades de la différenciation lymphocytaire T chez la souris. De façon intéressante, quel que soit le sous-groupe de LAL-T, les cellules leucémiques expriment toutes CD44. CD44 est le récepteur à l'acide hyaluronique, l'ostéopontine et la fibronectine. Il a été montré que CD44 est impliqué dans la domiciliation dans la MO des cellules leucémiques de LMC et LAM (Jin et al., 2006; Krause et al., 2006). Comparées aux vertèbres thoraciques, les cellules leucémiques des vertèbres caudales de la plupart des LAL-T expriment des taux plus élevés de CD44 à leur surface. Afin de connaître

son implication dans la capacité à migrer vers la MO, nous avons réduit l'augmentation induite de CD44 à la surface des cellules leucémiques dans les vertèbres caudales, puis les cellules ont été injectées en souris secondaire. Contrairement à notre postulat, les cellules leucémiques présentant une diminution d'expression du CD44 à leur surface ne voient pas leur capacité de migration vers la MO diminuée. Bien que très préliminaire car mené avec 1 seule LAL-T, ce résultat ne s'accorde pas avec les données publiées récemment par le laboratoire de M.L Toribio qui montre que la diminution d'expression de CD44 dans les cellules de LAL-T de patient abolit la capacité à générer la leucémie en souris immunodéficientes (García-Peydró et al., 2018). Dans cet article, la diminution d'expression n'est pas précisée, nous pouvons penser que notre diminution d'environ 50% en ARN et en protéine ne suffit pas à récapituler le phénotype observé dans la publication.

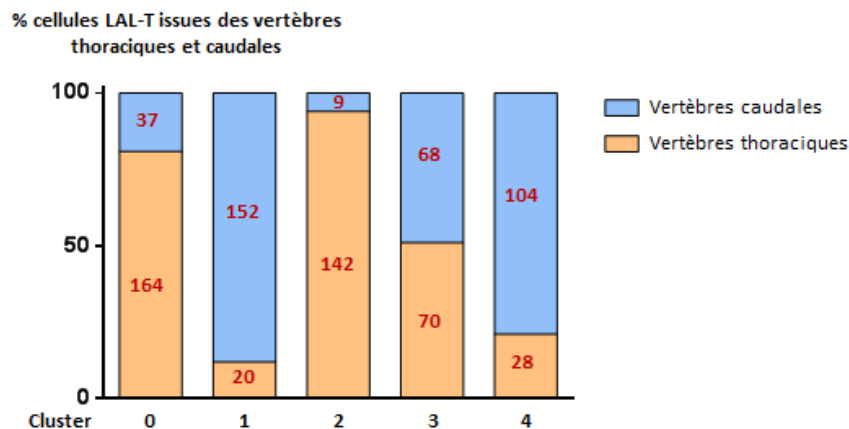
En s'associant avec le TGF-RI, CD44 est également impliqué dans la mise en quiescence des cellules (Zöller, 2015). Nous nous sommes demandé si la quiescence induite dans les cellules de LAL-T des vertèbres caudales était le résultat de la sur-expression de CD44. Pour cela, j'ai analysé le phénotype des cellules leucémiques des deux territoires dans lesquelles j'ai diminué l'expression de CD44. Que les cellules leucémiques expriment plus ou moins CD44 n'impacte pas leur niveau de quiescence dans les vertèbres caudales. En effet, les cellules leucémiques restent majoritairement en phase G0 du cycle cellulaire malgré la diminution d'expression. Toutefois, dans notre expérience, la diminution d'expression de CD44 à la surface des cellules leucémiques des vertèbres caudales ne permet pas d'obtenir une expression équivalente à celle observée pour les cellules leucémiques des vertèbres thoraciques. On peut donc se demander si la diminution d'expression obtenue avec le shCD44 n'est pas assez importante pour diminuer l'induction de la quiescence.

L'altération d'expression de protéines clés des cellules leucémiques par la MO adipocytaire reste une piste largement intéressante pour 1) chercher à les déloger et 2) essayer de les activer pour les rendre plus sensibles aux chimiothérapies.

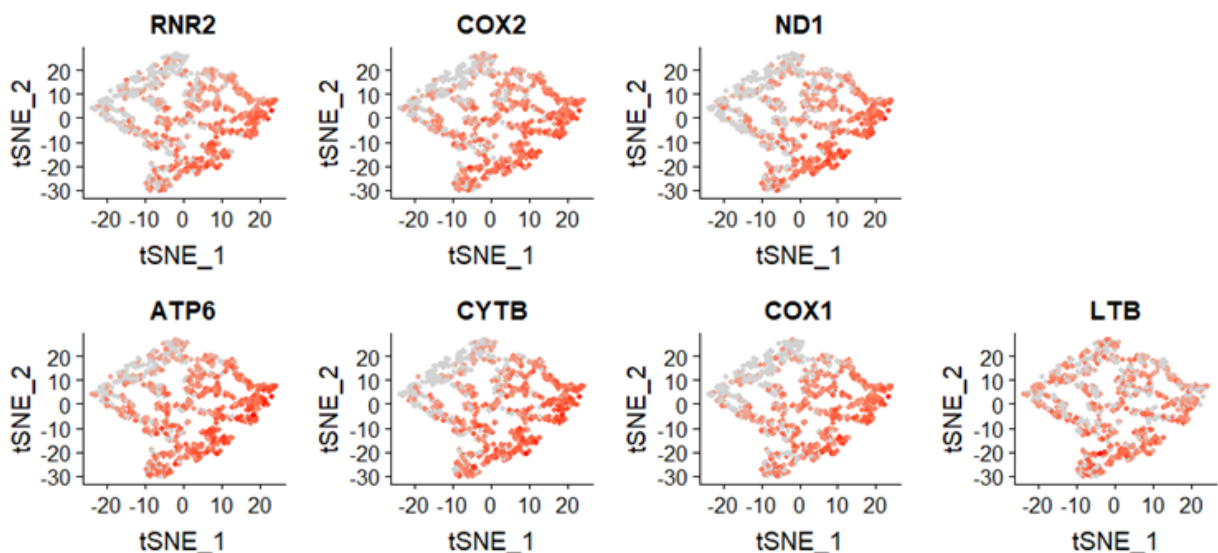




**Figure 41** : Analyse de l'expression transcriptomique de cellules uniques (Single Cell RNA Seq) pour étudier l'hétérogénéité cellulaire des LAL-T dans les vertèbres thoraciques et caudales. Visualisation t-SNE (pour t-distributed Stochastic Neighbour Embedding) des clusters cellulaires obtenus avec des duplicats de cellules issues des vertèbres thoraciques et des vertèbres caudales (n = 794 cellules). Chaque cluster est représenté par une couleur.



**Figure 42** : Répartition des cellules leucémiques issues soit des vertèbres thoraciques (orange) soit des vertèbres caudales (bleu) dans les différents clusters identifiés. En rouge sont indiqués le nombre de cellules des différents territoires par cluster.



**Figure 43** : Niveau d'expression de 7 gènes impliqués dans la signature transcriptomique des clusters 1 et 4 dans la représentation en t-SNE.

## II. Existe-t-il des « niches » dans la MO hématopoïétique qui induisent la chimiorésistance des cellules leucémiques?

Afin de montrer le rôle du tissu adipeux médullaire constitutif sur le développement de la LAL-T, nous avons utilisé les vertèbres caudales de la souris. Ces vertèbres caudales sont essentiellement constituées d'adipocytes. Puisque la MO hématopoïétique contient une faible proportion d'adipocytes, nous avons émis l'hypothèse que les cellules leucémiques des vertèbres thoraciques peuvent aussi interagir avec ces cellules. Les adipocytes des vertèbres thoraciques pourraient représenter une niche de chimiorésistance comme l'est la MO adipocytaire des vertèbres caudales.

Pour répondre à cette question nous avons décidé de mener une analyse en Single Cell RNA Seq des cellules leucémiques issues des vertèbres thoraciques comparées à celles issues des vertèbres caudales. Si notre hypothèse se vérifie, alors certaines cellules leucémiques issues des vertèbres thoraciques auront une signature transcriptomique comparable à celle des vertèbres caudales.

Les cellules leucémiques extraites des deux territoires médullaires ont été analysées en Single Cell RNA Seq par la technologie Biorad (ddSeq®). Deux réplicats techniques sont analysés pour les cellules leucémiques des vertèbres thoraciques et caudales.

L'analyse bio-informatique obtenue avec la LAL-T #3 a permis d'identifier 5 sous populations cellulaires nommés clusters (**Figure 41**). Chaque cluster est défini par un ensemble de cellules qui partagent une signature transcriptomique similaire. Les clusters 0 et 2 sont essentiellement composés de cellules issues des vertèbres thoraciques, le cluster 3 est un mélange équivalent de cellules issues des vertèbres thoraciques et caudales et enfin les clusters 1 et 4 sont essentiellement composés des cellules des vertèbres caudales (**Figure 42**). Dans ces deux derniers clusters, environ 15% des cellules sont issues des vertèbres thoraciques alors que 85% sont issues des vertèbres caudales. Au regard de ce résultat, nous observons donc qu'il existe dans la MO des vertèbres thoraciques un petit contingent de cellules qui présentent un profil d'expression commun à celui exprimé par une majorité de cellules leucémiques hébergées par les vertèbres caudales. Ce profil d'expression rappelle celui observé dans l'analyse globale (non sur cellule unique) à savoir que les gènes dont l'expression est la plus différente entre les MO thoraciques et les MO caudales sont impliqués dans l'activité mitochondriale (*COX1*, *COX2*, *ND1*, *ATP6*, *RNR2*, *CYTB*). Un autre gène de la signature transcriptomique enrichie dans le cluster 1 est retrouvé dans l'analyse globale : il s'agit du gène *LTB* (pour *Lymphotoxine β*) (**Figure 43**) (Cahu et al., 2017).

Une étude publiée en 2016 montre, dans les échantillons de patients, l'existence d'une population rare de cellules leucémiques non cyclantes/dormantes. En effet, l'injection à des souris immunodéficientes de cellules de LAL préalablement marquées avec le colorant membranaire CFSE a montré qu'une population rare de cellules leucémiques reste marquée au CFSE 1 mois après la transplantation. Les auteurs ont montré que la population non cyclante CFSE<sup>+</sup> est 1) capable de régénérer la leucémie en transplantation sériée, 2) résiste au traitement de chimiothérapie *in vivo*, 3) présente une signature transcriptomique de type « CSH ». Les auteurs ont également montré que les cellules de MRD chez le patient partagent une signature transcriptomique commune avec les cellules dormantes CFSE<sup>+</sup>. Cette étude a principalement été menée avec des échantillons de LAL-B humains et seulement un échantillon de LAL-T (Ebinger et al., 2016).

Bien que la caractérisation moléculaire des cellules dormantes de LAL ait été faite uniquement avec les échantillons de LAL-B, il sera intéressant de tester **1)** si les cellules de LAL-T retrouvées dans les vertèbres caudales restent en grande proportion CFSE<sup>+</sup> et **2)** si l'expression des gènes que nous trouvons enrichis dans notre analyse transcriptomique à l'échelon uni-cellulaire figurent également parmi les gènes enrichis dans les cellules de LAL-T/CFSE<sup>+</sup>. Ces résultats permettraient de rapprocher les résultats publiés chez les LAL-B à notre modèle d'étude pour les LAL-T (Ebinger et al., 2016). S. Ebinger et ses collègues montrent que les cellules dormantes de LAL-B qui échappent au traitement de chimiothérapie sont responsables de la rechute, comme le sont les cellules CFSE<sup>+</sup> de LAL-B. Il semble donc pertinent d'étudier si les cellules de LAL-T qui résistent à la poly-chimiothérapie *in vivo* que nous avons développée, sont aussi principalement des cellules CFSE<sup>+</sup>. D'autre part, effectuer l'analyse du transcriptome des cellules qui échappent au traitement permettrait de savoir si elles présentent également un enrichissement de la signature transcriptomique que nous avons identifiée.

Dans l'étude de S. Ebinger et collègues (Ebinger et al., 2016), les cellules obtenues après le traitement par la poly-chimiothérapie ont des caractéristiques communes avec les cellules des MRD des patients. Il est donc pertinent d'étudier l'enrichissement de cette signature transcriptomique pour les cellules leucémiques au cours de la MRD chez le patient. Si tel est le cas, alors, analyser en Single Cell RNA Seq les prélèvements au diagnostic de MO de LAL-T semble également très intéressant. En effet, étudier dans ces échantillons s'il existe une population rare de cellules leucémiques qui ressemblent transcriptionnellement aux cellules des MRD et/ou CFSE<sup>+</sup> et/ou des vertèbres caudales, permettrait de prédire le risque de rechute. Comme expliqué précédemment, l'expression de *LTB* est enrichie à la fois dans

les analyses transcriptomiques globale et en Single Cell RNA Seq. Il serait donc pertinent de tester si l'expression génique est accompagnée par l'expression protéique de surface de LTB et ainsi d'analyser les cellules leucémiques des patients (diagnostic, MRD, rechute). Si l'expression protéique reflète l'expression génique, et que les cellules de MRD expriment plus intensément ce marqueur, alors l'expression de LTB pourrait être prédictive de la rechute des LAL-T.

La protéine LTB est une protéine membranaire aussi connue sous le nom de TNF-C (pour Tumor Necrosis Factor-C). Les lymphotoxines  $\alpha$  et  $\beta$  sont principalement produites par les lymphocytes T et les cellules NK activés. Ces lymphotoxines peuvent être retrouvées sous forme d'homotrimères solubles de  $LT\alpha$  ou d'hétérotrimères  $LT\alpha\beta_2$  reliés à la membrane. Interagissant avec son récepteur  $LT\beta R$  (pour Lymphotoxine  $\beta$  receptor), cet hétérotrimère est impliqué dans de nombreux processus biologique tels que l'inflammation, la croissance tumorale, la propagation de métastase (Korneev et al., 2017) et l'ontogenèse des organes lymphoïdes primaires et secondaires (Boehmer, 1997; Fütterer et al., 1998). De façon intéressante, le tissu adipeux blanc adjacent aux ganglions lymphatiques contient des précurseurs d'adipocytes qui ont le potentiel de se différencier également en cellules stromales qui composent les ganglions lymphatiques. Dans ce contexte, l'activation de  $LT\beta R$  entraîne l'inhibition de l'adipogenèse au profit de la différenciation stromale qui composent les ganglions lymphatiques et ainsi permettre le support de la survie des lymphocytes T (Bénézech et al., 2012). L'ensemble de ces données nous encourage naturellement à porter notre intérêt sur cette variation d'expression. Elle pourrait correspondre à une réponse des cellules leucémiques de LAL-T à un environnement qui leur est moins propice.

L'analyse que nous avons effectué en Single Cell RNA Seq montre une sur-expression de transcrits codant des protéines impliquées dans l'activité mitochondriale. Ainsi, il semble que les modifications métaboliques que l'on observe dans les cellules leucémiques issues de la MO adipocytaire participent également à l'éducation d'une population minoritaire de cellules leucémiques dans les MO hématopoïétiques. Nous chercherons à savoir si ces modifications métaboliques sont responsables de l'accumulation des cellules en phase G0 du cycle cellulaire, si tel est le cas, cibler le métabolisme des cellules leucémiques pourrait ainsi empêcher leur quiescence/dormance.

### III. Cellules Initiatrices de Leucémies (CILs)

Les Cellules Initiatrices de Leucémies (CILs) représentent une population cellulaire rare qui possède des propriétés de cellules « souches » ce qui les distingue des autres cellules composant la leucémie. Ainsi les CILs sont capables 1) d'initier la leucémie lors de la transplantation en souris immunodéficientes, 2) de générer l'hétérogénéité tumorale, 3) d'être transplantées en souris immunodéficientes de façon sériées (capacité d'auto-renouvellement) et 4) d'être résistantes aux drogues utilisées en chimiothérapie.

Ainsi, depuis la définition des CILs en 2006 (Clarke et al., 2006) de nombreux travaux ont montré, en se basant sur l'expression de marqueurs de surface, que des populations cellulaires retrouvées dans les LAM et les LAL-T étaient enrichies en CILs à la fois pour les échantillons de patients et les modèles murins (Gerby et al., 2011; McCormack et al., 2010; Poglio et al., 2015; Thomas and Majeti, 2017; Tremblay et al., 2010). En revanche, les études menées avec les LAL-B montrent une absence d'enrichissement de CILs dans toutes les sous-populations phénotypiquement triables des LAL-B (CD34/CD38/CD19) (Lang et al., 2017; Weiland et al., 2016). Les LAL-B font donc exception puisqu'il semble exister une certaine plasticité d'expression de marqueurs de surface rendant impossible l'identification par cette voie des CILs (Lang et al., 2017; Weiland et al., 2016).

Comme expliqué précédemment, S. Ebinger et ses collègues ont utilisé un colorant le CFSE afin d'isoler une population de cellules rares de LAL-B (CFSE<sup>+</sup>), se divisant rarement, capables de répondre aux caractéristiques des CILs (Ebinger et al., 2016). Malgré le fait que ces cellules sont résistantes aux agents utilisés en chimiothérapie, leur capacité à initier la leucémie est identique à celle obtenue avec la population CFSE<sup>-</sup>. Cette étude conforte l'idée que la capacité à initier la leucémie des LAL-B ne semble pas définir une population particulière. De ce point de vue, les LAL-B semblent totalement différentes des autres hémopathies aiguës. De façon intéressante, nous avons montré que les cellules de LAL-T retrouvées dans les vertèbres caudales et thoraciques présentent la même fréquence en CILs (Cahu et al., 2017). Puisque la MO adipocytaire des vertèbres caudales modifie les expressions des différents marqueurs à la surface des cellules de LAL-T, il apparaît qu'utiliser des marqueurs qui définissent les CILs dans la MO hématopoïétique n'est pas idéal pour isoler la même population dans les vertèbres caudales. Ainsi, comme les LAL-B, les CILs de LAL-T présentent une plasticité d'expression des marqueurs de surface en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent.

Il est donc nécessaire de considérer avec prudence les marqueurs de surface pour identifier les CILs. Au regard de la littérature et de notre étude, il n'existe pas une **seule** MO mais de **nombreuses** MO différentes chez le mammifère. Il est probable qu'il n'y ait pas un phénotype commun aux cellules leucémiques issues de MO mais autant de phénotypes qu'il y a de MO. Cette notion émergente pourrait expliquer les divergences majeures constatées dans la littérature au sujet de l'identification la « niche » leucémique de la MO du calvarium (os du crâne) vs des tibias (Hawkins et al., 2016; Pitt et al., 2015). Soutenu par les travaux menés par F. Lassailly et ses collègues, nous pouvons ainsi penser que, à un âge donné, la composition osseuse, l'architecture et la disponibilité des « niches » sont différentes dans l'ensemble des os (Lassailly et al., 2013).



## Bibliographie

---

- Adolfsson J., Mansson R., Buza-Vidas N., Hultquist A., Liuba K., Jensen C.T., Bryder D., Yang L., Borge O.J., Thoren L.A. et al. (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised rad map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306.
- Al-Asadi, M.G., Brindle, G., Castellanos, M., May, S.T., Mills, K.I., Russell, N.H., Seedhouse, C.H., and Pallis, M. (2017). A molecular signature of dormancy in CD34+CD38- acute myeloid leukaemia cells. *Oncotarget* **8**, 111405–111418.
- Ambrosi, T.H., Scialdone, A., Graja, A., Gohlke, S., Jank, A.-M., Bocian, C., Woelk, L., Fan, H., Logan, D.W., Schürmann, A., et al. (2017). Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell* **20**, 771-784.e6.
- Amylon, M.D., Shuster, J., Pullen, J., Berard, C., Link, M.P., Wharam, M., Katz, J., Yu, A., Laver, J., Ravindranath, Y., et al. (1999). Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* **13**, 335–342.
- Anderson, G., and Takahama, Y. (2012). Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol.* **33**, 256–263.
- Anjos-Afonso, F., Currie, E., Palmer, H.G., Foster, K.E., Taussig, D.C., and Bonnet, D. (2013). CD34(-) cells at the apex of the human hematopoietic stem cell hierarchy have distinctive cellular and molecular signatures. *Cell Stem Cell* **13**, 161–174.
- Anthony, B.A., and Link, D.C. (2014). Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* **35**, 32–37.
- Aplan, P.D., Jones, C.A., Chervinsky, D.S., Zhao, X., Ellsworth, M., Wu, C., McGuire, E.A., and Gross, K.W. (1997). An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J.* **16**, 2408–2419.
- Aref, S., Ibrahim, L., Azmy, E., and Al Ashary, R. (2013). Impact of serum adiponectin and leptin levels in acute leukemia. *Hematology* **18**, 198–203.
- Armstrong, F., Brunet de la Grange, P., Gerby, B., Rouyez, M.-C., Calvo, J., Fontenay, M., Boissel, N., Dombret, H., Baruchel, A., Landman-Parker, J., et al. (2009). NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood* **113**, 1730–1740.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., and Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**, 1303–1313.
- Asada, N., Katayama, Y., Sato, M., Minagawa, K., Wakahashi, K., Kawano, H., Kawano, Y., Sada, A., Ikeda, K., Matsui, T., et al. (2013). Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell* **12**, 737–747.

- Asada, N., Takeishi, S., and Frenette, P.S. (2017). Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Int. J. Hematol.* *106*, 45–54.
- Aster, J.C., Xu, L., Karnell, F.G., Patriub, V., Pui, J.C., and Pear, W.S. (2000). Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 7505–7515.
- Balgobind, B.V., Van Vlierberghe, P., van den Ouweland, A.M.W., Beverloo, H.B., Terlouw-Kromosoeto, J.N.R., van Wering, E.R., Reinhardt, D., Horstmann, M., Kaspers, G.J.L., Pieters, R., et al. (2008). Leukemia-associated NF1 inactivation in patients with pediatric T-ALL and AML lacking evidence for neurofibromatosis. *Blood* *111*, 4322–4328.
- Barata, J.T., Cardoso, A.A., Nadler, L.M., and Boussiotis, V.A. (2001). Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). *Blood* *98*, 1524–1531.
- Barata, J.T., Silva, A., Brandao, J.G., Nadler, L.M., Cardoso, A.A., and Boussiotis, V.A. (2004a). Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Exp. Med.* *200*, 659–669.
- Barata, J.T., Keenan, T.D., Silva, A., Nadler, L.M., Boussiotis, V.A., and Cardoso, A.A. (2004b). Common gamma chain-signaling cytokines promote proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* *89*, 1459–1467.
- Bargut, T.C.L., Aguila, M.B., and Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2016). Brown adipose tissue: Updates in cellular and molecular biology. *Tissue Cell* *48*, 452–460.
- Bartelt, A., and Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* *10*, 24–36.
- Baryawno, N., Przybylski, D., Kowalczyk, M.S., Kfoury, Y., Severe, N., Gustafsson, K., Kokkalis, K.D., Mercier, F., Tabaka, M., Hofree, M., et al. (2019). A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell* *177*, 1915–1932.e16.
- Battula, V.L., Chen, Y., Cabreira, M. da G., Ruvolo, V., Wang, Z., Ma, W., Konoplev, S., Shpall, E., Lyons, K., Strunk, D., et al. (2013). Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. *Blood* *122*, 357–366.
- Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M., and Peault, B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*, 2804–2808.
- Behan, J.W., Yun, J.P., Proektor, M.P., Ehsanipour, E.A., Arutyunyan, A., Moses, A.S., Avramis, V.I., Louie, S.G., Butturini, A., Heisterkamp, N., et al. (2009). Adipocytes impair leukemia treatment in mice. *Cancer Res.* *69*, 7867–7874.
- Belluschi, S., Calderbank, E.F., Ciaurro, V., Pijuan-Sala, B., Santoro, A., Mende, N., Diamanti, E., Sham, K.Y.C., Wang, X., Lau, W.W.Y., et al. (2018). Myelo-lymphoid lineage restriction

occurs in the human haematopoietic stem cell compartment before lymphoid-primed multipotent progenitors. *Nat Commun* 9, 4100.

Belmonte, M., Hoofd, C., Weng, A.P., and Giambra, V. (2016). Targeting leukemia stem cells: which pathways drive self-renewal activity in T-cell acute lymphoblastic leukemia? *Curr Oncol* 23, 34–41.

Belver, L., and Ferrando, A. (2016). The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 16, 494–507.

Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., and van't Veer, M.B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9, 1783–1786.

Bénézech, C., Mader, E., Desanti, G., Khan, M., Nakamura, K., White, A., Ware, C.F., Anderson, G., and Caamaño, J.H. (2012). Lymphotoxin- $\beta$  Receptor Signaling through NF- $\kappa$ B2-RelB Pathway Reprograms Adipocyte Precursors as Lymph Node Stromal Cells. *Immunity* 37, 721–734.

Benyoucef, A., Palii, C.G., Wang, C., Porter, C.J., Chu, A., Dai, F., Tremblay, V., Rakopoulos, P., Singh, K., Huang, S., et al. (2016). UTX inhibition as selective epigenetic therapy against TAL1-driven T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev.* 30, 508–521.

Bhatia, M., Bonnet, D., Kapp, U., Wang, J.C., Murdoch, B., and Dick, J.E. (1997). Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J. Exp. Med.* 186, 619–624.

Blom, B., and Spits, H. (2006). Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 287–320.

Boehmer, H. von (1997). Lymphotoxins: From cytotoxicity to lymphoid organogenesis. *PNAS* 94, 8926–8927.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.

Bosma, M.J., and Carroll, A.M. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 323–350.

Boyd, A.L., Reid, J.C., Salci, K.R., Aslostovar, L., Benoit, Y.D., Shapovalova, Z., Nakanishi, M., Porras, D.P., Almakadi, M., Campbell, C.J.V., et al. (2017). Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelo-erythropoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche. *Nat. Cell Biol.* 19, 1336–1347.

Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678–689.

Broxmeyer, H.E., Orschell, C.M., Clapp, D.W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P.A., Liles, W.C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T.B., et al. (2005). Rapid mobilization of murine and

human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med* 201, 1307–1318.

Buonamici, S., Trimarchi, T., Ruocco, M.G., Reavie, L., Cathelin, S., Mar, B.G., Klinakis, A., Lukyanov, Y., Tseng, J.-C., Sen, F., et al. (2009). CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature* 459, 1000–1004.

Cahu, X., Calvo, J., Poglio, S., Prade, N., Colsch, B., Arcangeli, M.-L., Leblanc, T., Petit, A., Baleyrier, F., Baruchel, A., et al. (2017a). Bone marrow sites differently imprint dormancy and chemoresistance to T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv* 1, 1760–1772.

Cahu, X., Calvo, J., Poglio, S., Prade, N., Colsch, B., Arcangeli, M.-L., Leblanc, T., Petit, A., Baleyrier, F., Baruchel, A., et al. (2017b). Bone marrow sites differently imprint dormancy and chemoresistance to T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv* 1, 1760–1772.

Cai, J., Wang, J., Huang, Y., Wu, H., Xia, T., Xiao, J., Chen, X., Li, H., Qiu, Y., Wang, Y., et al. (2016). ERK/Drp1-dependent mitochondrial fission is involved in the MSC-induced drug resistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Dis* 7, e2459.

Calvi, L.M., and Link, D.C. (2015). The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood* 126, 2443–2451.

Calvo, J., BenYucef, A., Baijer, J., Rouyez, M.-C., and Pflumio, F. (2012). Assessment of human multi-potent hematopoietic stem/progenitor cell potential using a single in vitro screening system. *PLoS ONE* 7, e50495.

Campana, D., and Leung, W. (2013). Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 162, 147–161.

Canté-Barrett, K., Spijkers-Hagelstein, J. a. P., Buijs-Gladdines, J.G.C. a. M., Uitdehaag, J.C.M., Smits, W.K., van der Zwet, J., Buijsman, R.C., Zaman, G.J.R., Pieters, R., and Meijerink, J.P.P. (2016). MEK and PI3K-AKT inhibitors synergistically block activated IL7 receptor signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 30, 1832–1843.

Canté-Barrett, K., Mendes, R.D., Li, Y., Vroegindewey, E., Pike-Overzet, K., Wabeke, T., Langerak, A.W., Pieters, R., Staal, F.J.T., and Meijerink, J.P.P. (2017). Loss of CD44dim Expression from Early Progenitor Cells Marks T-Cell Lineage Commitment in the Human Thymus. *Front Immunol* 8, 32.

Carrelha, J., Meng, Y., Kettyle, L.M., Luis, T.C., Norfo, R., Alcolea, V., Boukarabila, H., Grasso, F., Gambardella, A., Grover, A., et al. (2018). Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature* 554, 106–111.

Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., et al. (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153, 1025–1035.

- Castillo, J.J., Mulkey, F., Geyer, S., Kolitz, J.E., Blum, W., Powell, B.L., George, S.L., Larson, R.A., and Stone, R.M. (2016). Relationship between obesity and clinical outcome in adults with acute myeloid leukemia: A pooled analysis from four CALGB (alliance) clinical trials. *Am. J. Hematol.* *91*, 199–204.
- Ceredig, R., Lynch, F., and Medveczky, J. (1988). Phenotypic analysis of mouse thymus development. *Immunol. Res.* *7*, 265–278.
- Chiu, P.P.L., Jiang, H., and Dick, J.E. (2010). Leukemia-initiating cells in human T-lymphoblastic leukemia exhibit glucocorticoid resistance. *Blood* *116*, 5268–5279.
- Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., and Shaper, J.H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* *133*, 157–165.
- Clappier, E., Gerby, B., Sigaux, F., Delord, M., Touzri, F., Hernandez, L., Ballerini, P., Baruchel, A., Pflumio, F., and Soulier, J. (2011). Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J. Exp. Med.* *208*, 653–661.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* *66*, 9339–9344.
- Cojoc, M., Peitzsch, C., Trautmann, F., Polishchuk, L., Telegeev, G.D., and Dubrovskaya, A. (2013). Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Oncotargets Ther* *6*, 1347–1361.
- Cordeiro Gomes, A., Hara, T., Lim, V., Herndler-Brandsetter, D., Nevius, E., Sugiyama, T., Tani-Ichi, S., Schlenner, S., Richie, E., Rodewald, H., et al. (2016). Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. - PubMed - NCBI. *Immunity* *1219–1231*.
- Cousin, B., Casteilla, L., Laharrague, P., Luche, E., Lorsignol, A., Cuminetti, V., and Paupert, J. (2016). Immuno-metabolism and adipose tissue: The key role of hematopoietic stem cells. *Biochimie* *124*, 21–26.
- Coustan-Smith, E., Mullighan, C.G., Onciu, M., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Pei, D., Cheng, C., Su, X., Rubnitz, J.E., Basso, G., et al. (2009). Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* *10*, 147–156.
- Cox, C.V., Martin, H.M., Kearns, P.R., Virgo, P., Evely, R.S., and Blair, A. (2007). Characterization of a progenitor cell population in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *109*, 674–682.
- De Bie, J., Demeyer, S., Alberti-Servera, L., and Geerdens, E. (2018). Single-cell sequencing reveals the origin and the order of mutation acquisition in T-cell acute lymphoblastic leukemia. - PubMed - NCBI.

- De Clercq, E. (2003). The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* 2, 581–587.
- De Grandis, M., Lhoumeau, A.-C., Mancini, S.J.C., and Aurrand-Lions, M. (2016). Adhesion receptors involved in HSC and early-B cell interactions with bone marrow microenvironment. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 687–703.
- De Keersmaecker, K., Real, P.J., Gatta, G.D., Palomero, T., Sulis, M.L., Tosello, V., Van Vlierberghe, P., Barnes, K., Castillo, M., Sole, X., et al. (2010). The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation. *Nat. Med.* 16, 1321–1327.
- De Keersmaecker, K., Atak, Z.K., Li, N., Vicente, C., Patchett, S., Girardi, T., Gianfelici, V., Geerdens, E., Clappier, E., Porcu, M., et al. (2013). Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 45, 186–190.
- Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495, 231–235.
- Domanska, U.M., Kruizinga, R.C., Nagengast, W.B., Timmer-Bosscha, H., Huls, G., de Vries, E.G.E., and Walenkamp, A.M.E. (2013). A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur. J. Cancer* 49, 219–230.
- Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L.T., Ohashi, P.S., and Dick, J.E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat. Immunol.* 11, 585–593.
- Eaves, C.J. (2015). Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 125, 2605–2613.
- Ebinger, S., Özdemir, E.Z., Ziegenhain, C., Tiedt, S., Alves, C.C., Grunert, M., Dworzak, M., Lutz, C., Turati, V.A., Enver, T., et al. (2016). Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 30, 849–862.
- Ehsanipour, E.A., Sheng, X., Behan, J.W., Wang, X., Butturini, A., Avramis, V.I., and Mittelman, S.D. (2013). Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer Res.* 73, 2998–3006.
- Erpaneedi, R., Belousov, V.V., Schäfers, M., and Kiefer, F. (2016). A novel family of fluorescent hypoxia sensors reveal strong heterogeneity in tumor hypoxia at the cellular level. *EMBO J.* 35, 102–113.
- Fazeli, P.K., Horowitz, M.C., MacDougald, O.A., Scheller, E.L., Rodeheffer, M.S., Rosen, C.J., and Klibanski, A. (2013). Marrow fat and bone--new perspectives. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 935–945.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872–877.



- Flomenberg, N., Devine, S.M., Dpersio, J.F., Liesveld, J.L., McCarty, J.M., Rowley, S.D., Vesole, D.H., Badel, K., and Calandra, G. (2005). The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 106, 1867–1874.
- Frasca, D., and Blomberg, B.B. (2017). Adipose Tissue Inflammation Induces B Cell Inflammation and Decreases B Cell Function in Aging. *Front Immunol* 8, 1003.
- Frazier, T., Lee, S., Bowles, A., Semon, J., Bunnell, B., Wu, X., and Gimble, J. (2018). Gender and age-related cell compositional differences in C57BL/6 murine adipose tissue stromal vascular fraction. *Adipocyte* 7, 183–189.
- Fujisaki, J., Wu, J., Carlson, A.L., Silberstein, L., Putheti, P., Larocca, R., Gao, W., Saito, T.I., Lo Celso, C., Tsuyuzaki, H., et al. (2011). In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature* 474, 216–219.
- Fütterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M.H., and Pfeffer, K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 9, 59–70.
- Galy, A., Travis, M., Cen, D., Chen, B. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 4, 459–473.
- García-Peydró, M., Fuentes, P., Mosquera, M., García-León, M.J., Alcain, J., Rodríguez, A., García de Miguel, P., Menéndez, P., Weijer, K., Spits, H., et al. (2018). The NOTCH1/CD44 axis drives pathogenesis in a T cell acute lymphoblastic leukemia model. *J. Clin. Invest.* 128, 2802–2818.
- García-Ramírez, I., Bhatia, S., Rodríguez-Hernández, G., González-Herrero, I., Walter, C., González de Tena-Dávila, S., Parvin, S., Haas, O., Woessmann, W., Stanulla, M., et al. (2018). Lmo2 expression defines tumor cell identity during T-cell leukemogenesis. *EMBO J.* 37.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 39, 1003–1018.
- Gerby, B., Clappier, E., Armstrong, F., Deswarte, C., Calvo, J., Poglio, S., Soulier, J., Boissel, N., Leblanc, T., Baruchel, A., et al. (2011). Expression of CD34 and CD7 on human T-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations. *Leukemia* 25, 1249–1258.
- Gerby, B., Tremblay, C.S., Tremblay, M., Rojas-Sutterlin, S., and Herblot, S. (2014). SCL, LMO1 and Notch1 reprogram thymocytes into self-renewing cells. - PubMed - NCBI.
- Giambra, V., Jenkins, C.R., Wang, H., Lam, S.H., Shevchuk, O.O., Nemirovsky, O., Wai, C., Gusscott, S., Chiang, M.Y., Aster, J.C., et al. (2012). NOTCH1 promotes T cell leukemia-initiating activity by RUNX-mediated regulation of PKC- $\theta$  and reactive oxygen species. *Nat. Med.* 18, 1693–1698.

Girardi, T., Vicente, C., Cools, J., and De Keersmaecker, K. (2017). The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood* 129, 1113–1123.

Girardi, T., Vereecke, S., Sulima, S.O., Khan, Y., Fancello, L., Briggs, J.W., Schwab, C., de Beeck, J.O., Verbeeck, J., Royaert, J., et al. (2018). The T-cell leukemia-associated ribosomal RPL10 R98S mutation enhances JAK-STAT signaling. *Leukemia* 32, 809–819.

Goardon, N., Marchi, E., Atzberger, A., Quek, L., Schuh, A., Soneji, S., Woll, P., Mead, A., Alford, K.A., Rout, R. et al. (2011). Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 19, 138-152.

Gökbuget, N., Kneba, M., Raff, T., Trautmann, H., Bartram, C.-R., Arnold, R., Fietkau, R., Freund, M., Ganser, A., Ludwig, W.-D., et al. (2012). Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood* 120, 1868–1876.

Goldberg, J.M., Silverman, L.B., Levy, D.E., Dalton, V.K., Gelber, R.D., Lehmann, L., Cohen, H.J., Sallan, S.E., and Asselin, B.L. (2003). Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J. Clin. Oncol.* 21, 3616–3622.

González-García, S., García-Peydró, M., Martín-Gayo, E., Ballestar, E., Esteller, M., Bornstein, R., de la Pompa, J.L., Ferrando, A.A., and Toribio, M.L. (2009). CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R $\alpha$  gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J. Exp. Med.* 206, 779–791.

Götte, M., and Yip, G.W. (2006). Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res.* 66, 10233–10237.

Greenbaum, A., Hsu, Y.-M.S., Day, R.B., Schuettpelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495, 227–230.

Haddad, R., Guardiola, P., Izac, B., Thibault, C., Radich, J., Delezoide, A.-L., Baillou, C., Lemoine, F.M., Gluckman, J.C., Pflumio, F., et al. (2004). Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood* 104, 3918–3926.

Haddad, R., Guimiot, F., Six, E., Jourquin, F., Setterblad, N., Kahn, E., Yagello, M., Schiffer, C., Andre-Schmutz, I., Cavazzana-Calvo, M., et al. (2006). Dynamics of thymus-colonizing cells during human development. *Immunity* 24, 217–230.

Han, J., Koh, Y.J., Moon, H.R., Ryoo, H.G., Cho, C.-H., Kim, I., and Koh, G.Y. (2010). Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 115, 957–964.

Hao, Q.L., Shah, A.J., Thiemann, F.T., Smogorzewska, E.M., and Crooks, G.M. (1995). A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 86, 3745–3753.

- Hao, Q.L., Zhu, J., Price, M.A., Payne, K.J., Barsky, L.W., Crooks, G.M. (2001) Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood* 97, 3683-3290.
- Hawkins, E.D., Duarte, D., Akinduro, O., Khorshed, R.A., Passaro, D., Nowicka, M., Straszowski, L., Scott, M.K., Rothery, S., Ruivo, N., et al. (2016). T-cell acute leukaemia exhibits dynamic interactions with bone marrow microenvironments. *Nature* 538, 518–522.
- Hermetet, F., Buffiere, A., Aznague, A., Pais de Barros, J., Bastie, J., Delva, L., and Quéré, R. (2019). High-fat diet disturbs lipid raft/TGF- $\beta$  signaling-mediated maintenance of hematopoietic stem cells in mouse bone marrow. - PubMed - NCBI. *Nature Communications*.
- Hoggatt, J., Singh, P., Tate, T.A., Chou, B.-K., Datari, S.R., Fukuda, S., Liu, L., Kharchenko, P.V., Schajnovitz, A., Baryawno, N., et al. (2018). Rapid Mobilization Reveals a Highly Engraftable Hematopoietic Stem Cell. *Cell* 172, 191-204.e10.
- Hong, D., Gupta, R., Ancliff, P., Atzberger, A., Brown, J., Soneji, S., Green, J., Colman, S., Piacibello, W., Buckle, V., et al. (2008). Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* 319, 336–339.
- Hoofd, C., Wang, X., Lam, S., Jenkins, C., Wood, B., Giambra, V., and Weng, A.P. (2016). CD44 promotes chemoresistance in T-ALL by increased drug efflux. *Exp. Hematol.* 44, 166-171.e17.
- Hozumi, K., Mailhos, C., Negishi, N., Hirano, K., Yahata, T., Ando, K., Zuklys, S., Holländer, G.A., Shima, D.T., and Habu, S. (2008). Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J. Exp. Med.* 205, 2507–2513.
- Hunger, S.P., and Mullighan, C.G. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N. Engl. J. Med.* 373, 1541–1552.
- Iacobucci, I., and Mullighan, C.G. (2017). Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 35, 975–983.
- Inaba, H., and Pui, C.-H. (2010). Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 11, 1096–1106.
- Jacobsen, S.E.W., and Nerlov, C. (2019). Haematopoiesis in the era of advanced single-cell technologies. *Nat. Cell Biol.* 21, 2–8.
- Jeannet, R., Mastio, J., Macias-Garcia, A., Oravecz, A., Ashworth, T., Geimer Le Lay, A.-S., Jost, B., Le Gras, S., Ghysdael, J., Gridley, T., et al. (2010). Oncogenic activation of the Notch1 gene by deletion of its promoter in Ikaros-deficient T-ALL. *Blood* 116, 5443–5454.
- Jin, F., Zhai, Q., Qiu, L., Meng, H., Zou, D., Wang, Y., Li, Q., Yu, Z., Han, J., Li, Q., et al. (2008). Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Bone Marrow Transplant.* 42, 581–588.
- Jin, L., Hope, K.J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F., and Dick, J.E. (2006). Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat. Med.* 12, 1167–1174.

Jöhrer, K., Ploner, C., Thangavadivel, S., Wuggenig, P., and Greil, R. (2015). Adipocyte-derived players in hematologic tumors: useful novel targets? *Expert Opin Biol Ther* *15*, 61–77.

Juarez, J., Dela Pena, A., Baraz, R., Hewson, J., Khoo, M., Cisterne, A., Fricker, S., Fujii, N., Bradstock, K.F., and Bendall, L.J. (2007). CXCR4 antagonists mobilize childhood acute lymphoblastic leukemia cells into the peripheral blood and inhibit engraftment. *Leukemia* *21*, 1249–1257.

Karamitros, D., Stoilova, B., Aboukhalil, Z., Hamey, F., Reinisch, A., Samitsch, M., Quek, L., Otto, G., Repapi, E., Doondeea, J., et al. (2018). Single-cell analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells. *Nat. Immunol.* *19*, 85–97.

Kelliher, M.A., Seldin, D.C., and Leder, P. (1996). Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. *EMBO J.* *15*, 5160–5166.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 377–391.

Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., Manley, N.R., Duarte, A., Macdonald, H.R., and Radtke, F. (2008). Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J. Exp. Med.* *205*, 2515–2523.

Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* *91*, 661–672.

Korneev, K.V., Atretkhany, K.-S.N., Drutskaya, M.S., Grivennikov, S.I., Kuprash, D.V., and Nedospasov, S.A. (2017). TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Cytokine* *89*, 127–135.

Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., and May, W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* *87*, 1–13.

Krause, D.S., Lazarides, K., von Andrian, U.H., and Van Etten, R.A. (2006). Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nat. Med.* *12*, 1175–1180.

Kreso, A., and Dick, J.E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* *14*, 275–291.

Krings, A., Rahman, S., Huang, S., Lu, Y., Czernik, P.J., and Lecka-Czernik, B. (2012). Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes. *Bone* *50*, 546–552.

Kurd, N., and Robey, E.A. (2016). T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol. Rev.* *271*, 114–126.

Lang, F., Wojcik, B., Bothur, S., Knecht, C., Falkenburg, J.H.F., Schroeder, T., Serve, H., Ottmann, O.G., and Rieger, M.A. (2017). Plastic CD34 and CD38 expression in adult B-cell

precursor acute lymphoblastic leukemia explains ambiguity of leukemia-initiating stem cell populations. *Leukemia* 31, 731–734.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., and Murdoch, B. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. - PubMed - NCBI.

Larson, R.C., Fisch, P., Larson, T.A., Lavenir, I., Langford, T., King, G., and Rabbitts, T.H. (1994). T cell tumours of disparate phenotype in mice transgenic for Rb1-2. *Oncogene* 9, 3675–3681.

Larsson, S.C., and Wolk, A. (2008). Overweight and obesity and incidence of leukemia: a meta-analysis of cohort studies. *Int. J. Cancer* 122, 1418–1421.

Lassailly, F., Foster, K., Lopez-Onieva, L., Currie, E., and Bonnet, D. (2013). Multimodal imaging reveals structural and functional heterogeneity in different bone marrow compartments: functional implications on hematopoietic stem cells. *Blood* 122, 1730–1740.

Laurenti, E., and Göttgens, B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553, 418–426.

Lazarus, H.M., Richards, S.M., Chopra, R., Litzow, M.R., Burnett, A.K., Wiernik, P.H., Franklin, I.M., Tallman, M.S., Cook, L., Buck, G., et al. (2006). Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: results from the international ALL trial MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood* 108, 465–472.

Li, Z., Hardij, J., Bagchi, D.P., Scheller, E.L., and MacDougald, O.A. (2018). Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues. *Bone* 110, 134–140.

Lim, M., Pang, Y., Ma, S., Hao, S., Shi, H., Zheng, Y., Hua, C., Gu, X., Yang, F., Yuan, W., et al. (2016). Altered mesenchymal niche cells impede generation of normal hematopoietic progenitor cells in leukemic bone marrow. *Leukemia* 30, 154–162.

Liu, L., Shen, W., Ueno, M., Patel, S., and Kraemer, F. (2011). Characterization of age-related gene expression profiling in bone marrow and epididymal adipocytes. - PubMed - NCBI. *BMC Genomics*.

Lock, R.B., Liem, N., Farnsworth, M.L., Milross, C.G., Xue, C., Tajbakhsh, M., Haber, M., Norris, M.D., Marshall, G.M., and Rice, A.M. (2002). The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse. *Blood* 99, 4100–4108.

Love, P.E., and Bhandoola, A. (2011). Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 469–477.

Lu, Z., Xie, J., Wu, G., Shen, J., Collins, R., Chen, W., Kang, X., Luo, M., Zou, Y., Huang, L.J.-S., et al. (2017). Fasting selectively blocks development of acute lymphoblastic leukemia via leptin-receptor upregulation. *Nat. Med.* 23, 79–90.

Luche, E., Sengenès, C., Arnaud, E., Laharrague, P., Casteilla, L., and Cousin, B. (2015). Differential Hematopoietic Activity in White Adipose Tissue Depending on its Localization. *J. Cell. Physiol.* *230*, 3076–3083.

Majeti, R., Park, C.Y., and Weissman, I.L. (2007). Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* *1*, 635–645.

Mansour, M.R., Abraham, B.J., Anders, L., Berezovskaya, A., Gutierrez, A., Durbin, A.D., Etchin, J., Lawton, L., Sallan, S.E., Silverman, L.B., et al. (2014). Oncogene regulation. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. *Science* *346*, 1373–1377.

Manz, M.G., Miyamoto, T., Akashi, K., and Weissman, I.L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 11872–11877.

Marks, D.I., Paietta, E.M., Moorman, A.V., Richards, S.M., Buck, G., DeWald, G., Ferrando, A., Fielding, A.K., Goldstone, A.H., Ketterling, R.P., et al. (2009). T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood* *114*, 5136–5145.

Marques, L., Noronha, E., Dos Santos-Bueno, F., Mansur, M., Terra-Granado, E., and Pombo-de-Oliveira, M. (2018). CD44 Expression Profile Varies According to Maturational Subtypes and Molecular Profiles of Pediatric T-Cell Lymphoblastic Leukemia. - PubMed - NCBI. *Frontiers in Oncology*.

Márquez, C., Trigueros, C., Fernández, E., and Toribio, M.L. (1995). The development of T and non-T cell lineages from CD34+ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44. *J. Exp. Med.* *181*, 475–483.

Mattiucci, D., Maurizi, G., Izzi, V., Cenci, L., Ciarlantini, M., Mancini, S., Mensà, E., Pascarella, R., Vivarelli, M., Olivieri, A., et al. (2018). Bone marrow adipocytes support hematopoietic stem cell survival. *J. Cell. Physiol.* *233*, 1500–1511.

McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., and Oettinger, M.A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* *83*, 387–395.

McCormack, M.P., Young, L.F., Vasudevan, S., de Graaf, C.A., Codrington, R., Rabbitts, T.H., Jane, S.M., and Curtis, D.J. (2010). The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. *Science* *327*, 879–883.

Medina, E.A., Oberheu, K., Polusani, S.R., Ortega, V., Velagaleti, G.V.N., and Oyajobi, B.O. (2014). PKA/AMPK signaling in relation to adiponectin's antiproliferative effect on multiple myeloma cells. *Leukemia* *28*, 2080–2089.

Medyouf, H., Gusscott, S., Wang, H., Tseng, J.-C., Wai, C., Nemirovsky, O., Trumpp, A., Pflumio, F., Carboni, J., Gottardis, M., et al. (2011). High-level IGF1R expression is required

for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. *J. Exp. Med.* **208**, 1809–1822.

Melão, A., Spit, M., Cardoso, B.A., and Barata, J.T. (2016). Optimal interleukin-7 receptor-mediated signaling, cell cycle progression and viability of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells rely on casein kinase 2 activity. *Haematologica* **101**, 1368–1379.

Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829–834.

Minuzzo, S., Agnusdei, V., Pusceddu, I., Pinazza, M., Moserle, L., Masiero, M., Rossi, E., Crescenzi, M., Hoey, T., Ponzoni, M., et al. (2015). DLL4 regulates NOTCH signaling and growth of T acute lymphoblastic leukemia cells in NOD/SCID mice. *Carcinogenesis* **36**, 115–121.

Mullighan, C.G., Phillips, L.A., Su, X., Ma, J., Miller, C.B., Shurtleff, S.A., and Downing, J.R. (2008). Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* **322**, 1377–1380.

Navarro, J.-M., Touzart, A., Pradel, L.C., Loosveld, M., Koubi, M., Fenouil, R., Le Noir, S., Maqbool, M.A., Morgado, E., Gregoire, C., et al. (2015). Site- and allele-specific polycomb dysregulation in T-cell leukaemia. *Nat Commun* **6**, 6094.

Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460**, 259–263.

Nemoto, Y., Kanai, T., Takahara, M., Oshima, S., Nakamura, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., and Watanabe, M. (2013). Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells. *Gut* **62**, 1142–1152.

Nguyen, T.-V., Melville, A., Nath, S., Story, C., Howell, S., Sutton, R., Zannettino, A., and Revesz, T. (2015). Bone Marrow Recovery by Morphometry during Induction Chemotherapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *PLoS ONE* **10**, e0126233.

Nitta, T., and Suzuki, H. (2016). Thymic stromal cell subsets for T cell development. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 1021–1037.

Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poepl, A., Jurisica, I., and Dick, J.E. (2011). Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment. *Science* **333**, 218–221.

Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O.I., Wilson, G., Kaufmann, K.B., McLeod, J., Laurenti, E., Dunant, C.F., et al. (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* **351**, aab2116.



Ntziachristos, P., Tsirigos, A., Van Vlierberghe, P., Nedjic, J., Trimarchi, T., Flaherty, M.S., Ferres-Marco, D., da Ros, V., Tang, Z., Siegle, J., et al. (2012). Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* *18*, 298–301.

Ntziachristos, P., Tsirigos, A., Welstead, G.G., Trimarchi, T., Bakogianni, S., Xu, L., Loizou, E., Holmfeldt, L., Strikoudis, A., King, B., et al. (2014). Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* *514*, 513–517.

O’Neil, J., Grim, J., Strack, P., Rao, S., Tibbitts, D., Winter, C., Hardwick, J., Welcker, M., Meijerink, J.P., Pieters, R., et al. (2007). FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J. Exp. Med.* *204*, 1813–1824.

Pasarica, M., Sereda, O.R., Redman, L.M., Albarado, D.C., Hymel, D.T., Roan, L.E., Rood, J.C., Burk, D.H., and Smith, S.R. (2009). Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* *58*, 718–725.

Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C.S.-O., Berenguer, A., Prats, N., Toll, A., Hueto, J.A., et al. (2017). Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* *541*, 41–45.

Passaro, D., Irigoyen, M., Catherinet, C., Gachet, S., Da Costa De Jesus, C., Lasgi, C., Tran Quang, C., and Ghysdael, J. (2015). CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* *27*, 769–779.

Passaro, D., Quang, C.T., and Ghysdael, J. (2016). Microenvironmental cues for T-cell acute lymphoblastic leukemia development. *Immunol. Rev.* *271*, 156–172.

Peled, A., Klein, S., Beider, K., Burger, J.A., and Abraham, M. (2018). Role of CXCL12 and CXCR4 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cytokine* *109*, 11–16.

Peterson, K.R., Flaherty, D.K., and Hasty, A.H. (2017). Obesity Alters B Cell and Macrophage Populations in Brown Adipose Tissue. *Obesity (Silver Spring)* *25*, 1881–1884.

Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R.S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., et al. (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat. Immunol.* *3*, 687–694.

Petrie, H.T., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 649–679.

Pitt, L.A., Tikhonova, A.N., Hu, H., Trimarchi, T., King, B., Gong, Y., Sanchez-Martin, M., Tsirigos, A., Littman, D.R., Ferrando, A.A., et al. (2015). CXCL12-Producing Vascular Endothelial Niches Control Acute T Cell Leukemia Maintenance. - PubMed - NCBI. *Cancer Cell*.

Poglio, S., De Toni, F., Arnaud, E., Laharrague, P., Espinosa, E., Casteilla, L., and Cousin, B. (2010). Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. - PubMed - NCBI. *Stem Cells*.

Poglio, S., De Toni, F., Lewandowski, D., Minot, A., Arnaud, E., Barroca, V., Laharrague, P., Casteilla, L., and Cousin, B. (2012). In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood* *120*, 4952–4962.

Poglio, S., Cahu, X., Uzan, B., Besnard-Guérin, C., Lapillonne, H., Leblanc, T., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Petit, A., Baleyrier, F., et al. (2015). Rapid childhood T-ALL growth in xenograft models correlates with mature phenotype and NF- $\kappa$ B pathway activation but not with poor prognosis. *Leukemia* *29*, 977–980.

Poglio, S., Lewandowski, D., Calvo, J., Caye, A., Gros, A., Laharanne, E., Leblanc, T., Landman-Parker, J., Baruchel, A., Soulier, J., et al. (2016). Speed of leukemia development and genetic diversity in xenograft models of T cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* *7*, 41599–41611.

Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 159–169.

Pramanik, R., Sheng, X., Ichihara, B., Heisterkamp, N., and Mittelman, S.D. (2013). Adipose tissue attracts and protects acute lymphoblastic leukemia cells from chemotherapy. *Leuk. Res.* *37*, 503–509.

Pui, C.-H., and Evans, W.E. (2006). Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *354*, 166–178.

Pui, C.-H., and Evans, W.E. (2013). A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* *50*, 185–196.

Pui, C.-H., Relling, M.V., and Downing, J.R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *350*, 1535–1548.

Pui, C.-H., Mullighan, C.G., Evans, W.E., and Relling, M.V. (2012). Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? - PubMed - NCBI. *Blood*.

Pui, C.-H., Yang, J.J., Hunger, S.P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., Vora, A., Baruchel, A., Silverman, L.B., Schmiegelow, K., et al. (2015). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J. Clin. Oncol.* *33*, 2938–2948.

Rajasagi, M., Vitacolonna, M., Benjak, B., Marhaba, R., and Zöller, M. (2009). CD44 promotes progenitor homing into the thymus and T cell maturation. *J. Leukoc. Biol.* *85*, 251–261.

Ramirez, P., Rettig, M.P., Uy, G.L., Deych, E., Holt, M.S., Ritchey, J.K., and DiPersio, J.F. (2009). BIO5192, a small molecule inhibitor of VLA-4, mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* *114*, 1340–1343.

Rausch, M.E., Weisberg, S., Vardhana, P., and Tortoriello, D.V. (2008). Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)* 32, 451–463.

Renou, L., Boelle, P.-Y., Deswarte, C., Spicuglia, S., Benyoucef, A., Calvo, J., Uzan, B., Belhocine, M., Cieslak, A., Landman-Parker, J., et al. (2017). Homeobox protein TLX3 activates miR-125b expression to promote T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv* 1, 733–747.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156, 20–44.

Rowley, J.D. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290–293.

Rozovski, U., Harris, D.M., Li, P., Liu, Z., Jain, P., Ferrajoli, A., Burger, J., Thompson, P., Jain, N., Wierda, W., et al. (2018). STAT3-activated CD36 facilitates fatty acid uptake in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget* 9, 21268–21280.

Samuels, A.L., Beesley, A.H., Yadav, B.D., Papa, R.A., Sutton, R., Anderson, D., Marshall, G.M., Cole, C.H., Kees, U.R., and Lock, R.B. (2014). A pre-clinical model of resistance to induction therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J* 4, e232.

Sanchez-Gurmaches, J., and Guertin, D.A. (2014). Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat Commun* 5, 4099.

Sasseti, C., Tangemann, K., Singer, M.S., Kershaw, D.B., and Rosen, S.D. (1998). Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J. Exp. Med.* 187, 1965–1975.

Schatz, D.G., and Swanson, P.C. (2011). V(D)J Recombination : Mechanisms of Initiation. *Annu. Rev. Genet.* 45, 167-202.

Scheller, E.L., Doucette, C.R., Learman, B.S., Cawthorn, W.P., Khandaker, S., Schell, B., Wu, B., Ding, S.-Y., Bredella, M.A., Fazeli, P.K., et al. (2015). Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nat Commun* 6, 7808.

Scourzic, L., Couronné, L., Pedersen, M.T., Della Valle, V., Diop, M., Mylonas, E., Calvo, J., Mouly, E., Lopez, C.K., Martin, N., et al. (2016). DNMT3A(R882H) mutant and Tet2 inactivation cooperate in the deregulation of DNA methylation control to induce lymphoid malignancies in mice. *Leukemia* 30, 1388–1398.

Scupoli, M.T., Vinante, F., Krampera, M., Vincenzi, C., Nadali, G., Zampieri, F., Ritter, M.A., Eren, E., Santini, F., and Pizzolo, G. (2003). Thymic epithelial cells promote survival of human T-cell acute lymphoblastic leukemia blasts: the role of interleukin-7. *Haematologica* 88, 1229–1237.

Scupoli, M.T., Perbellini, O., Krampera, M., Vinante, F., Cioffi, F., and Pizzolo, G. (2007). Interleukin 7 requirement for survival of T-cell acute lymphoblastic leukemia and human thymocytes on bone marrow stroma. *Haematologica* 92, 264–266.

Seike, M., Omatsu, Y., Watanabe, H., Kondoh, G., and Nagasawa, T. (2018). Stem cell niche-specific Ebf3 maintains the bone marrow cavity. *Genes Dev.*

Senbanjo, L.T., and Chellaiah, M.A. (2017). CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol* 5, 18.

Sheng, X., and Mittelman, S.D. (2014). The role of adipose tissue and obesity in causing treatment resistance of acute lymphoblastic leukemia. *Front Pediatr* 2, 53.

Sheng, X., Tucci, J., Parmentier, J.-H., Ji, L., Behan, J.W., Heisterkamp, N., and Mittelman, S.D. (2016). Adipocytes cause leukemia cell resistance to daunorubicin via oxidative stress response. *Oncotarget* 7, 73147–73159.

Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Schweitzer, I.B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T.V., and Greiner, D.L. (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* 154, 180–191.

Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., et al. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 174, 6477–6489.

Silva, A., Laranjeira, A.B.A., Martins, L.R., Cardoso, B.A., Demengeot, J., Yunes, J.A., Seddon, B., and Barata, J.T. (2011). IL-7 contributes to the progression of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Cancer Res.* 71, 4780–4789.

Six, E.M., Bonhomme, D., Monteiro, M., Beldjord, K., Jurkowska, M., Cordier-Garcia, C., Garrigue, A., Dal Cortivo, L., Rocha, B., Fischer, A., et al. (2007). A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus. *J. Exp. Med.* 204, 3085–3093.

Sodek, J., Chen, J., Nagata, T., Kasugai, S., Todescan, R., Li, I.W., and Kim, R.H. (1995). Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 760, 223–241.

Spyrou, N., Avgerinos, K.I., Mantzoros, C.S., and Dalamaga, M. (2018). Classic and Novel Adipocytokines at the Intersection of Obesity and Cancer: Diagnostic and Therapeutic Strategies. *Curr Obes Rep* 7, 260–275.

Tabe, Y., Konopleva, M., Munsell, M.F., Marini, F.C., Zompetta, C., McQueen, T., Tsao, T., Zhao, S., Pierce, S., Igari, J., et al. (2004). PML-RARalpha is associated with leptin-receptor induction: the role of mesenchymal stem cell-derived adipocytes in APL cell survival. *Blood* 103, 1815–1822.

Tabe, Y., Yamamoto, S., Saitoh, K., Sekihara, K., Monma, N., Ikeo, K., Mogushi, K., Shikami, M., Ruvolo, V., Ishizawa, J., et al. (2017). Bone Marrow Adipocytes Facilitate Fatty Acid

Oxidation Activating AMPK and a Transcriptional Network Supporting Survival of Acute Monocytic Leukemia Cells. *Cancer Res.* 77, 1453–1464.

Taghon, T., Van de Walle, I., De Smet, G., De Smedt, M., Leclercq, G., Vandekerckhove, B., and Plum, J. (2009). Notch signaling is required for proliferation but not for differentiation at a well-defined beta-selection checkpoint during human T-cell development. *Blood* 113, 3254–3263.

Takahashi, M., Matsuoka, Y., Sumide, K., Nakatsuka, R., Fujioka, T., Kohno, H., Sasaki, Y., Matsui, K., Asano, H., Kaneko, K., et al. (2014). CD133 is a positive marker for a distinct class of primitive human cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cells. *Leukemia* 28, 1308–1315.

Tan, G., Shi, L., Li, Q., and Wang, M. (2015). Adiponectin enhances Imatinib anti-tumour activity in human chronic myeloid leukaemia cells with serum levels associated with Imatinib efficacy in early chronic phase patients. *Cell Prolif.* 48, 486–496.

Tatarek, J., Cullion, K., Ashworth, T., Gerstein, R., Aster, J.C., and Kelliher, M.A. (2011). Notch1 inhibition targets the leukemia-initiating cells in a Tal1/Lmo2 mouse model of T-ALL. *Blood* 118, 1579–1590.

Thomas, D., and Majeti, R. (2017). Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* 129, 1577–1585.

Tikhonova, A.N., Dolgalev, I., Hu, H., Sivaraj, K.K., Hoxha, E., Cuesta-Domínguez, Á., Pinho, S., Akhmetzyanova, I., Gao, J., Witkowski, M., et al. (2019). The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature* 569, 222–228.

Tramont, P.C., Tosello-Tramont, A.-C., Shen, Y., Duley, A.K., Sutherland, A.E., Bender, T.P., Littman, D.R., and Ravichandran, K.S. (2010). CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nat. Immunol.* 11, 162–170.

Trayhurn, P. (2014). Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. *Annu. Rev. Nutr.* 34, 207–236.

Tremblay, M., Tremblay, C.S., Herblot, S., Aplan, P.D., Hébert, J., Perreault, C., and Hoang, T. (2010). Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes. *Genes Dev.* 24, 1093–1105.

Triplett, T.A., Cardenas, K.T., Lancaster, J.N., Hu, Z., Selden, H.J., Jasso, G.J., Balasubramanyam, S., Chan, K., Li, L., Chen, X., et al. (2016). Endogenous dendritic cells from the tumor microenvironment support T-ALL growth via IGF1R activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E1016-1025.

Uzan, B., Poglio, S., Gerby, B., Wu, C.L., Gross, J., Armstrong, F., Calvo, J., Cahu, X., Deswarte, C., Dumont, F., et al. (2014). Interleukin-18 produced by bone marrow-derived stromal cells supports T-cell acute leukaemia progression. - PubMed - NCBI. *EMBO Molecular Medicine.*

- Van de Walle, I., De Smet, G., De Smedt, M., Vandekerckhove, B., Leclercq, G., Plum, J., and Taghon, T. (2009). An early decrease in Notch activation is required for human TCR-alpha beta lineage differentiation at the expense of TCR-gammadelta T cells. *Blood* *113*, 2988–2998.
- Van de Walle, I., De Smet, G., Gärtner, M., De Smedt, M., Waegemans, E., Vandekerckhove, B., Leclercq, G., Plum, J., Aster, J.C., Bernstein, I.D., et al. (2011). Jagged2 acts as a Delta-like Notch ligand during early hematopoietic cell fate decisions. *Blood* *117*, 4449–4459.
- Van de Walle, I., Waegemans, E., De Medts, J., De Smet, G., De Smedt, M., Snauwaert, S., Vandekerckhove, B., Kerre, T., Leclercq, G., Plum, J., et al. (2013). Specific Notch receptor-ligand interactions control human TCR- $\alpha\beta/\gamma\delta$  development by inducing differential Notch signal strength. *J. Exp. Med.* *210*, 683–697.
- Van de Walle, I., Dolens, A.-C., Durinck, K., De Mulder, K., Van Loocke, W., Damle, S., Waegemans, E., De Medts, J., Velghe, I., De Smedt, M., et al. (2016). GATA3 induces human T-cell commitment by restraining Notch activity and repressing NK-cell fate. *Nat Commun* *7*, 11171.
- Van der Meulen, J., Van Roy, N., Van Vlierberghe, P., and Speleman, F. (2014). The epigenetic landscape of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *53*, 547–557.
- Vicente, C., Schwab, C., Broux, M., Geerdens, E., Degryse, S., Demeyer, S., Lahortiga, I., Elliott, A., Chilton, L., La Starza, R., et al. (2015). Targeted sequencing identifies associations between IL7R-JAK mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* *100*, 1301–1310.
- Waegemans, E., Van de Walle, I., De Medts, J., De Smedt, M., Kerre, T., Vandekerckhove, B., Leclercq, G., Wang, T., Plum, J., and Taghon, T. (2014). Notch3 activation is sufficient but not required for inducing human T-lineage specification. *J. Immunol.* *193*, 5997–6004.
- Wang, H., Leng, Y., and Gong, Y. (2018a). Bone Marrow Fat and Hematopoiesis. *Front. Endocrinol.* *9*.
- Wang, J., Liu, X., Qiu, Y., Shi, Y., Cai, J., Wang, B., Wei, X., Ke, Q., Sui, X., Wang, Y., et al. (2018b). Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Hematol Oncol* *11*, 11.
- Wang, W., Zimmerman, G., Huang, X., Yu, S., Myers, J., Wang, Y., Moreton, S., Nthale, J., Awadallah, A., Beck, R., et al. (2016). Aberrant Notch Signaling in the Bone Marrow Microenvironment of Acute Lymphoid Leukemia Suppresses Osteoblast-Mediated Support of Hematopoietic Niche Function. *Cancer Res.* *76*, 1641–1652.
- Weber, G.F., Ashkar, S., Glimcher, M.J., and Cantor, H. (1996). Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* *271*, 509–512.
- Wei, Q., and Frenette, P.S. (2018). Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity* *48*, 632–648.

Weiland, J., Pal, D., Case, M., Irving, J., Ponthan, F., Koschmieder, S., Heidenreich, O., von Stackelberg, A., Eckert, C., Vormoor, J., et al. (2016). BCP-ALL blasts are not dependent on CD19 expression for leukaemic maintenance. *Leukemia* 30, 1920–1923.

Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., and Aster, J.C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306, 269–271.

Wilkinson, A.C., Ishida, R., Kikuchi, M., Sudo, K., Morita, M., Crisostomo, R.V., Yamamoto, R., Loh, K.M., Nakamura, Y., Watanabe, M., et al. (2019). Long-term ex vivo haematopoietic-stem-cell expansion allows nonconditioned transplantation. *Nature* 571, 117–121.

Winkler, I.G., Sims, N.A., Pettit, A.R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., Poulton, I.J., van Rooijen, N., Alexander, K.A., Raggatt, L.J., et al. (2010). Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* 116, 4815–4828.

Winter, S.S., Sweatman, J.J., and Larson, R.S. (2000). Improved quantification of cell survival on stromal monolayers by flow cytometric analyses. *Cytometry* 40, 26–31.

Winter, S.S., Sweatman, J.J., Lawrence, M.B., Rhoades, T.H., Hart, A.L., and Larson, R.S. (2001). Enhanced T-lineage acute lymphoblastic leukaemia cell survival on bone marrow stroma requires involvement of LFA-1 and ICAM-1. *Br. J. Haematol.* 115, 862–871.

Wu, L., Kincade, P.W., and Shortman, K. (1993). The CD44 expressed on the earliest intrathymic precursor population functions as a thymus homing molecule but does not bind to hyaluronate. *Immunol. Lett.* 38, 69–75.

Wu, S., Zheng, C., Chen, S., Lin, B., Chen, Y., Zhou, W., and Li, Z. (2015). Adiponectin signals through Adiponectin Receptor 1 to reverse imatinib resistance in K562 human chronic myeloid leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 367–372.

Yamamoto, R., Morita, Y., Oeohara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph, K.L., Ema, H., and Nakauchi, H. (2013). Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* 154, 1112–1126.

Ye, H., Adane, B., Khan, N., Sullivan, T., Minhajuddin, M., Gasparetto, M., Stevens, B., Pei, S., Balys, M., Ashton, J.M., et al. (2016). Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell* 19, 23–37.

Yu, V.W.C., Saez, B., Cook, C., Lotinun, S., Pardo-Saganta, A., Wang, Y.-H., Lymperi, S., Ferraro, F., Raaijmakers, M.H.G.P., Wu, J.Y., et al. (2015). Specific bone cells produce DLL4 to generate thymus-seeding progenitors from bone marrow. *J. Exp. Med.* 212, 759–774.

Zenatti, P.P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L., Silva, M.C., Paganin, M., Tritapoe, J., Hixon, J.A., Silveira, A.B., Cardoso, B.A., et al. (2011). Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 43, 932–939.



Zhang, H., Brown, R.L., Wei, Y., Zhao, P., Liu, S., Liu, X., Deng, Y., Hu, X., Zhang, J., Gao, X.D., et al. (2019). CD44 splice isoform switching determines breast cancer stem cell state. *Genes Dev.* *33*, 166–179.

Zhao, H., Guo, L., Zhao, H., Zhao, J., Weng, H., and Zhao, B. (2015). CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget* *6*, 5022–5040.

Zhou, B.O., Yu, H., Yue, R., Zhao, Z., Rios, J.J., Naveiras, O., and Morrison, S.J. (2017). Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nat. Cell Biol.* *19*, 891–903.

Zöller, M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* *11*, 254–267.

Zöller, M. (2015). CD44, Hyaluronan, the Hematopoietic Stem Cell, and Leukemia-Initiating Cells. *Front Immunol* *6*, 235.

## Annexes

---

Les adipocytes de la MO sont des régulateurs négatifs de la vascularisation dans les vertèbres caudales de la souris (Zhou et al., 2017). Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse, que la MO adipocytaire des vertèbres caudales est un territoire globalement plus hypoxique que la MO non adipocytaire retrouvée dans les femurs et les vertèbres thoraciques des souris. Lucine Fahy, doctorante du laboratoire, a étudié l'impact *in vitro* de faibles concentrations d'oxygènes sur le développement des LAL-T et la réponse aux traitements chimiothérapeutiques. Les résultats obtenus dans cette étude rappellent grandement les phénotypes observés pour les cellules leucémiques extraites des vertèbres caudales des souris. J'ai pu apporter à plusieurs reprises un soutien technique à Lucine, pour les analyses de progression du cycle cellulaire, d'apoptose, de pouvoir mitochondriale évaluées en cytométrie en flux. Lucine Fahy a montré *in vitro* qu'une faible teneur d'oxygène (3,5 et 1% d'O<sub>2</sub>) induit une stabilisation d'HIF-1 $\alpha$  en partie responsable d'un ralentissement de la progression dans la division cellulaire ainsi qu'une accumulation des cellules leucémiques en phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire. L'ensemble de ces phénotypes aboutissent à la chimiorésistance des cellules leucémiques. La stabilisation d'HIF-1 $\alpha$  induit également une diminution de l'activation de la voie de signalisation mTOR qui participe au phénotype de chimiorésistance des cellules leucémiques (**Annexe 1**).

Durant mon Master 2 ainsi que le début de ma thèse, j'ai été également un support technique pour effectuer les dernières expériences clés du projet de Laurent Renou. Ce projet consiste à étudier l'implication du micro-ARN (miR) 125b dans le développement des LAL-T exprimant l'oncogène TLX3. Par stratégie de diminution ou de gain d'expression Laurent Renou a montré que la co-expression de miR125b et de TLX3 dans les LAL-T promeut la croissance cellulaire *in vitro* ainsi que l'invasion *in vivo*. Il a également montré que l'expression ectopique de miR125b ou de TLX3 dans les progéniteurs hématopoïétiques humains induit une accumulation de progéniteurs lymphoblastiques T à au stade d'arrêt de la différenciation observée pour les LAL-T exprimant l'oncogène TLX3. Pour cette étude, j'ai produit la grande partie des lentivirus utilisés et j'ai également suppléé Laurent lors des expériences de révisions du papier (**Annexe 2**). Ce travail qui ne porte pas sur le rôle du microenvironnement dans la progression tumorale m'a permis d'aborder également l'importance de l'addiction oncogénique des cellules de LAL-T.

J'ai également été associé à la publication de l'article de Sandrine Poglio dans lequel est étudié les variations génétiques retrouvées dans les fractions cellulaires CD34<sup>+</sup> CD7<sup>+</sup> et

CD34<sup>-</sup> CD7<sup>+</sup> des LAL-T comparées avec celles retrouvées dans la leucémie générée en souris immunodéficientes par ces différentes fractions. Sandrine a montré que dans le cas où les deux fractions cellulaires sont capables de générer la leucémie “rapidement” dans les souris immunodéficientes, alors elles sont génétiquement similaires entre elles et avec la leucémie résultant de la transplantation. A l’inverse, lorsque la leucémie est générée après une longue période de latence dans les souris, l’étude montre qu’elle est le résultat d’une sélection de sous-clone présent de façon minoritaire dans l’échantillon original. Cette étude montre que les cellules leucémiques qui ne greffent pas rapidement dans la souris immunodéficientes subissent une pression de sélection par le microenvironnement murin alors que ce n’est pas le cas quand la LAL-T est générée rapidement (**Annexe 3**). Sandrine ayant terminé son contrat Post Doctorale dans le laboratoire, j’ai été en charge d’effectuer les expériences suite au retour des reviewers.

Comme précisé en introduction, les LAL-T sont des leucémies sensibles à la chimiothérapie puisque chez l’enfant la remission atteint plus de 80%. En revanche, la rechute est de mauvais pronostic. Dans le cas des rechutes ou des LAL-T réfractaires, l’utilisation de thérapies innovantes telles que l’utilisation de lymphocytes T CAR (pour Chimeric Antigen Receptor). Le laboratoire de Pablo Menendez m’a associé au développement de lymphocytes CAR dirigés contre la molécule CD1a exprimée à la surface des cellules de LAL-T corticale. Cette étude montre que l’utilisation de ces lymphocytes T CAR présentent une cytotoxicité efficace contre les LAL-T *in vitro* mesurée avec des lignées et des cellules primaires de patients. Les lymphocytes T CAR inhibent également l’expansion leucémique *in vivo* mesurée également avec la lignée cellulaire Jurkat et avec des cellules primaires de patients. De façon très intéressante, les lymphocytes T CAR persistent dans la souris au point de pouvoir inhiber une transplantation secondaire de la LAL-T. De plus, ces cellules ne présentent pas de cytotoxicité contre les autres cellules hématopoïétiques. Dans cette étude, j’ai fourni au laboratoire de Pablo Menendez des cellules leucémiques de patients ainsi que les cellules issues des PDX exprimant à leur surface le CD1a (**Annexe 4**).

Enfin j’ai participé à l’étude publiée par le laboratoire d’Olivier Bernard en 2016 qui montre que la mutation DNMT3<sup>R882H</sup> et l’inactivation de TET2 (pour Ten Eleven Translocation 2) dans les CSPHs murins coopèrent pour induire des hémopathies dont des LAL-T. Au cours de cette étude j’ai effectué des expériences *in vitro* pour évaluer la dépendance à la voie NOTCH1 des LAL-T générées dans ce modèle. Ces mutations sont répertoriées dans les LAL-T des patients mais cette étude montre pour la première fois la coopération et l’implication de ces événements dans la leucémogénèse des LAL-T (**Annexe**

5). Grâce à cette étude, le laboratoire a pu accéder à des LAL-T murines générées autrement que par l'introduction d'ICN1.

## Annexe 1 :

### Hypoxia induces a dormancy state through mTOR signaling inhibition and promotes chemoresistance in T-ALL

(Submitted to Leukemia)

**L Fahy**<sup>1-4</sup>, **J Calvo**<sup>1-4†</sup>, S Chabi<sup>1-4†</sup>, R Haddad<sup>1-4</sup>, S Poglio<sup>1-4,5</sup>, T Leblanc<sup>6</sup>, A Petit<sup>7</sup>, A Baruchel<sup>6</sup>, P Ballerini<sup>7</sup>, I Naguibneva<sup>1-4</sup>, ML Arcangeli<sup>1-4</sup>, F Mazurier<sup>8,9</sup>, F Pflumio<sup>1-4\*</sup> and B Uzan<sup>1-4\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de recherche sur les cellules souches hématopoïétiques et leucémiques, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, CEA, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 1274, 92265 Fontenay aux Roses, France

<sup>3</sup> Université Paris Diderot, Paris 7, 92265 Fontenay aux Roses, France

<sup>4</sup> Université Paris Sud, Paris 11, 92265 Fontenay aux Roses, France

<sup>5</sup> Current adress : INSERM U1053-BaRITOn-Equipe Oncogénèse des lymphomes cutanés, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>6</sup> Service d'Héματο-Immuno-logie Pédiatrique, Hôpital Robert Debré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université Paris Diderot, Paris, France

<sup>7</sup> AP-HP, Service d'Hématologie Pédiatrique, Hôpital A. Trousseau, Paris, France

<sup>8</sup> Université de Tours, EA7501 GICC, Tours, France

<sup>9</sup> CNRS ERL7001 LNOx, Tours, France

\* co-authorship

† co-authorship

Correspondance: Benjamin Uzan, Laboratoire des cellules Souches Hématopoïétiques et Leucémiques, UMR1274, IRCM, CEA, 18 route du panorama, 92260, Fontenay-aux-Roses, France (phone: 33-1-46-54-86-17; FAX: 33-1-46-54-91-38, email: benjamin.uzan@cea.fr).

**Running title:** Hypoxia protects T-ALL from chemotherapy

**Word count:** 4575

**References:** 46

**Figures:** 5

**Keywords:** T-cell acute lymphoblastic leukemia, microenvironment, hypoxia, mTOR, chemoresistance

## **Abstract**

Resistance to chemotherapy, a major therapeutic challenge in the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), can be driven by interactions between leukemic cells and the microenvironment that promote survival of leukemic cells. The bone marrow, an important leukemia niche, has low oxygen partial pressures which highly participate in the regulation of normal hematopoiesis. Here we show that hypoxia inhibits the growth of T-ALL cells by slowing down cell cycle progression and decreasing metabolism, making them less sensitive to anti-leukemic drugs and preserving their ability to initiate leukemia after treatment. Knocking down (KD) hypoxia-induced factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), a key regulator of the cellular response to hypoxia, antagonized the effects observed in hypoxic T-ALL. Interestingly, activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) was diminished in hypoxic leukemic cells and treatment of T-ALL with the mTOR inhibitor rapamycin in normoxia mimicked the hypoxia effects, namely decreased cell growth, increased quiescence and drug resistance. Moreover HIF-1 $\alpha$  KD restored mTOR activation in low O<sub>2</sub> concentrations. In conclusion, our work shows that hypoxic niches play a protective role during the treatment of T-ALL and induce chemoresistance. Inhibition of HIF-1 $\alpha$  and/or activation of the mTOR pathway may help suppress the drug resistance of T-ALL in hypoxic niches.

## Introduction

Cancer treatments have greatly improved thanks to the progress of genomics. However, chemoresistance remains a major problem in eradicating cancer cells. Drug resistance may involve many molecular mechanisms including intrinsic metabolic adaptation of tumors, selection of cancer cells bearing additional mutations, activation of compensatory signaling pathways (1) as well as extrinsic induced-chemoprotection by the tumor microenvironment (2). In fact this resistance may rely at least partly on less proliferating or even quiescent tumor cells that escape treatments while retaining the ability to re-initiate cancer in relation with drugs meant to eliminate proliferating tumor cells.(3) Identifying and resolving resistance mechanisms are thus currently major challenges in cancer treatment. Targeting of such resistant cells will be efficient when the molecular mechanisms governing the quiescence of resistant cancer cells will be known.

T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is an aggressive hematological malignancy characterized by bone marrow infiltration of immature lymphoblasts derived from transformed T cell precursors (4). Following chemotherapy, the 5-year T-ALL event-free survival rate is nowadays less than 50% for adults (5) and about 80% for children, both having a particularly unfavorable prognosis at relapse (4). Drug-resistant blasts, that survived below the detection limit suggesting complete remission, may subsequently proliferate and cause relapse. The mechanisms underlying T-ALL chemoresistance are partially understood (6). Hypoxia is a key microenvironmental factor that influences the biology of hematopoietic stem cells, as well as of leukemic cells within the bone marrow (7,8). Under hypoxia, adaptive responses have been identified as downstream effects of Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) (9). HIF-1 is a master transcription factor for oxygen sensing. It is composed of an oxygen-regulated  $\alpha$  subunit (HIF-1 $\alpha$ ) and a constitutively expressed  $\beta$  subunit (HIF-1 $\beta$ ) (10). Under hypoxia, stabilized HIF-1 $\alpha$  dimerizes with HIF-1 $\beta$ , and translocates into the nucleus to promote target gene transcription allowing greater oxygen delivery to tissues (11). However, the determinants of HIF-1 $\alpha$  regulation are incompletely understood in the complex environment of cells (12). HIF-1 $\alpha$  protein levels are elevated in most solid tumors due to hypoxic stress or aberrant mutation of tumor suppressor (13). Clinical investigations revealed that elevation of HIF-1 $\alpha$  makes tumor cells more resistant to chemotherapy and increases the likelihood of metastasis and poor outcome (14). In this work, we investigated how low oxygen concentrations, hereafter called hypoxia, impact T-ALL proliferation, apoptosis and



leukemia-propagating activity. We identify a novel HIF-1 $\alpha$ /mTOR signaling loop that orchestrates quiescence of T-ALL cells and contributes to T-ALL chemoresistance.

## Results

### *Hypoxia modulates apoptosis, cell cycle and metabolism of T-ALL cells.*

Leukemic cells from 5 human T-ALL patient samples and 3 T-ALL mouse models (Suppl Table) were co-cultured with MS5 or MS5-DL1 stromal cells (16) for 4 days under 1%, 3.5% and under 21% O<sub>2</sub> (hereafter called normoxia). At the end of the culture, T-ALL cells were numbered using CD45 and CD7 expression on cells, as respective pan hematopoietic and T cell markers. We observed that hypoxia strongly inhibits CD45<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup> T-ALL cell growth with twice less cells in 3.5% O<sub>2</sub> than in normoxia and no growth in 1% O<sub>2</sub> condition. (Figure 1A & Suppl Figure 1A). A direct effect of hypoxia on leukemic cells (rather than a rebound effect on stromal cells) was tested on 3 human T-ALL that can grow without stromal support (T-ALL #1; #3; #4) in contrast to most of T-ALL samples (16). The results showed that hypoxia inhibits T-ALL growth even though stromal cells were absent from the culture (Suppl Figure 1A) suggesting that hypoxia directly affect T-ALL cells through cycle arrest or induced-cell death. Annexin-V staining showed that 4 days of hypoxia induces apoptosis in T-ALL cell population (2 and 6-fold increase for 3.5% O<sub>2</sub> and 1% O<sub>2</sub> respectively compared to the 21% O<sub>2</sub>), the analysis being done on all cells and cellular debris (Figure 1B). However, an analysis taking into account only the cells whose size and structure correspond to the lymphocyte type of cells indicates that under hypoxia some T-ALL cells persist that do not exhibit significant apoptosis (Suppl Figure 1B).

Further analyzes carried out using this typical lymphocyte gate showed that hypoxia also impacts T-ALL growth by increasing and reducing the respective levels of quiescent and cycling cells. Indeed, the percentage of leukemic cells in G0 was 33% and 40% in 3.5% O<sub>2</sub> and 1% O<sub>2</sub> vs 20% in 21% O<sub>2</sub> whereas 12% and 8% of cells in hypoxia vs 22% of cells in normoxia were in the S phase of cell cycle (Figure 1C & Suppl Figure 1C). As cell exposure to hypoxic conditions may also alter energetic metabolism through mitochondrial morphology, size and mean velocity (18), we next incubated T-ALL cultured in various O<sub>2</sub> concentrations with Mito Tracker Green (MTG) and TetraMethylRhodamine methyl Ester (TMRE). Low MTG and TMRE detection was observed in hypoxic compared to normoxic T-ALL cells, indicative of decreased mitochondrial mass, weaker activity or depolarization of the mitochondria membrane (Figure 1D). Altogether these data thus suggest an increased quiescence and a significant metabolic remodeling of leukemic blasts under hypoxia.

### *Hypoxia induces HIF target gene expression in T-ALL.*

Cell adaptation to hypoxia requires activation of transcriptional programs that coordinate expression of genes involved in oxygen delivery (notably via angiogenesis) and metabolic adaptation (via glycolysis and Oxphos) but also genes such as those implicated in trafficking in and out of hypoxic tissue microenvironments (via chemotactic responsiveness to SDF1/CXCR4) (19,20). First of all, we validated hypoxia in our culture through the expression of *HIF-1 $\alpha$* . As expected, the transcriptional expression of *HIF-1 $\alpha$*  remained equivalent in the leukemic cells whatever the O<sub>2</sub> level tested, whereas HIF-1 $\alpha$  protein is stabilized and translocated in the nucleus of T-ALL cells in hypoxic cultures (Suppl Figure 3Bi), which then triggered increased expression of target genes such as Vascular and Epithelial Growth Factor (*VEGF*), Glucose Transporter 3 (*GLUT3*), a high affinity glucose transporter (21) and C-X-C chemokine receptor type 4 (*CXCR4*). These expression levels were inversely correlated with O<sub>2</sub> levels (Figure 1E). Of note, the level of *EPAS1/HIF-2 $\alpha$*  transcript expression was very low in T-ALL cells, even in hypoxia conditions (Suppl Figure 1D).

#### ***Functional status of hypoxic T-ALL cells.***

Because T-ALL cultured in low O<sub>2</sub> levels are metabolically very different than their T-ALL counterpart cultured in normoxia, we tested their functional potentials, i.e. growth and leukemia propagating abilities, using *in vitro* and *in vivo* xenograft models. First, we observed that leukemic cells collected from hypoxia cultures, retain their ability to proliferate *in vitro* when they are re-incubated in normoxia for a long period. In practical cells recovered from the different O<sub>2</sub> level conditions were cultured in secondary normoxic cultures starting with same cell numbers. When leukemic cells issued from hypoxic T-ALL were analyzed shortly after secondary culture initiation (e.g. at 7 days), a difference was detected compared with leukemic cells recovered from normoxia during the overall culture (Figure 2A), suggesting that hypoxia imprinting on T-ALL growth remains significant in short term cultures. When the culture was extended for 3 additional weeks (e.g. up to day 28) in freshly renewed medium, T-ALL cells pre-cultured in hypoxia or normoxia then produced similar numbers of cells (Figure 2B), meaning that hypoxia did not abolish the *in vitro* growth capacity of T-ALL but rather froze the leukemic cells in a slow/quiescent state. In parallel, 500 leukemic cells collected after 4 days of hypoxic/normoxic cultures were injected into immune-deficient NSG mice. Leukemia development was measured by sampling mouse bone marrow (BM) at 4, 6 and 8 weeks after transplantation. The results indicate that leukemia gradually invaded the BM cavity overtime, reaching high levels at the latest time points (Figure 2C). Among the 3

samples tested, two T-ALL (#1 and #2) showed similar ability to propagate disease whether leukemic cells were pre-cultured in hypoxia or normoxia whereas hypoxic leukemic blasts were more aggressive in the third tested T-ALL (T-ALL#3, Figure 2D). Altogether these results show that hypoxia maintain the growth potential of T-ALL despite increased quiescence and major metabolic changes.

### ***Hypoxia and T-ALL chemoresistance.***

We then assumed that the intrinsic sensitivity of T-ALL to drugs might be different when leukemic cells were cultured in hypoxia or normoxia. To test that, leukemic cells were pre-incubated 24 hours under hypoxia or normoxia and thereafter treated during additional 72h in medium containing 10 nM vincristine sulfate, 500 nM cytarabine, or 100 nM dexamethasone while keeping O<sub>2</sub> tension low or high. At the end of the chemotherapy treatments a difference in the number of leukemic cells recovered was detected between hypoxic and normoxic conditions with more live cells after vincristine treatment in hypoxia than in normoxia (Figure 3A). By calculating the percentage of live cells after exposure or not to drugs, we further observed that hypoxic T-ALL cells display a lower sensitivity to cell-cycle-related vincristine and cytarabine drugs but also to dexamethasone compared with normoxic cells (Figure 3B & Suppl Figure 2A). Importantly, when the same numbers of live T-ALL cells, treated 72 hours with 10 nM vincristine in hypoxia and in normoxia, were further incubated without drugs during 7 days under normoxia, only hypoxic treated cells could grow back (Figure 3C), demonstrating low O<sub>2</sub> protects T-ALL from drugs. Similarly, cells treated with vincristine during hypoxia culture prior to transplant in immune deficient NSG mice generated leukemia faster in the mouse BM with mice succumbing between 2.5 and 10 weeks before those injected with the same number of leukemic cells treated with vincristine while in normoxia (Figure 3D-E & Suppl Figure 2B-C). These results indicate that hypoxic cultures lower T-ALL sensitivity to vincristine and thus may protect T-ALL from chemotherapy.

### ***HIFs and T-ALL hypoxic chemoresistance.***

Hypoxia has been shown to promote cancer stemness through HIF factors (22,23). Also HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  are elevated in various cancer patients and associated with poor prognosis (24). *HIF-2 $\alpha$*  transcripts being weakly expressed in T-ALL (Suppl Figure 1D), we focused our work on HIF-1 $\alpha$  and knocked down its expression to evaluate its role in hypoxia-mediated chemoresistance. The efficiency of the HIF-1 $\alpha$  shRNA (shHIF-1 $\alpha$ ) was measured in transduced and FACS-sorted T-ALL cultured under hypoxia or normoxia (Suppl Figure 3A).

A significant reduction in mRNA and protein levels was observed using shHIF-1 $\alpha$  vector relative to controls, with a decrease of 55%-85% mRNA expression depending on the tested leukemia (Figure 4A & Suppl Figure 3B). As a consequence of HIF-1 $\alpha$  KD in T-ALL, a significant reduction of *VEGF* and *GLUT3* target gene expression was detected in all tested T-ALL cultured in hypoxia, whereas *CXCR4* was decreased only in some of them (Figure 4A).

We next determined whether HIF-1 $\alpha$  silencing affects T-ALL cell growth *in vitro*. We first observed that the HIF-1 $\alpha$  KD (Suppl Figure 3B) did not interfere with T-ALL cell growth in normoxia indicating no obvious side effects of the two shHIF-1 $\alpha$  constructs (Figure 4B and Suppl Figure 3C). Interestingly, the growth of T-ALL cells, that is decreased in hypoxia, was partially restored upon HIF-1 $\alpha$  KD (Figure 4B and Suppl Figure 3C). Furthermore, when transduced T-ALL cells were cultured in hypoxia, the proportion of quiescent leukemic cells was lower in HIF-1 $\alpha$  KD compared to shCTL condition (Figure 4C and Suppl Figure 3D), indicating that T-ALL cells partially respond to decreased O<sub>2</sub> concentrations through a HIF-1 $\alpha$ -dependent change in cell cycle transition.

In accordance with the *in vitro* data, we observed that HIF-1 $\alpha$ -KD enhanced leukemia levels after T-ALL cells recovered after hypoxia had been transplanted in immune-deficient NSG mice, but with no major impact on the mouse survival (Suppl Figure 3E). Next, we used HIF-1 $\alpha$  KD T-ALL blasts to test whether HIF-1 $\alpha$  inhibition can modify hypoxia-induced drug resistance. We observed that lowering HIF-1 $\alpha$  in T-ALL decreases the hypoxia-mediated resistance to vincristine reaching same levels of live cells as T-ALL cells treated with vincristine in normoxia (Figure 4D). Moreover, these HIF-1 $\alpha$  KD T-ALL cells treated with vincristine in hypoxia were not able anymore to grow when re-cultured without drugs during 7 days under normoxic atmosphere unlike control cells (Figure 4E), indicating HIF1 $\alpha$  participates in the hypoxia-related resistance of T-ALL to drugs, such as vincristine.

### ***Hypoxia, mTOR activation and chemoresistance.***

In response to hypoxia, cells rapidly activate a variety of adaptive mechanisms that limit energy expenditure through inhibition of energy-intensive processes including protein translation (26,27). A major mechanism mediating this effect involves the mammalian target of rapamycin (mTOR) activity that is inhibited following exposure to hypoxia (28). In accordance, activation of the mTOR pathway was decreased in T-ALL cells cultured under hypoxia, with a significantly lower phosphorylation of mTOR and of 4EBP1 and S6R, two mTOR direct targets (Figure 5A and 5B). Interestingly, treating T-ALL with rapamycin, a

specific inhibitor of the mTOR protein kinase, mimics the effects of hypoxia. Indeed, rapamycin inhibits *in vitro* leukemic cell growth in normoxia (Figure 5C) by blocking cells in G0 while decreasing G1/S/G2-M progression (Figure 5D). Also T-ALL blasts pre-treated for 45 minutes with rapamycin prior to the addition, for 3 days, of anti-cancer drugs displayed a lower sensitivity to vincristine, cytarabine or dexamethasone in normoxia (Figure 5E & Suppl Figure 4). Furthermore, only cells pretreated with rapamycin could grow back in culture after they had undergone chemotherapeutic treatment (Figure 5F). Finally, the decrease of hypoxia-induced mTOR phosphorylation was abolished in HIF-1 $\alpha$  KD T-ALL cells (Figure 5G), showing that HIF-1 $\alpha$  contributes to the inhibition of the mTOR pathway in hypoxia. These results indicate that in T-ALL, HIF-1 $\alpha$  activation during hypoxia induces mTOR repression that in consequence contributes to drug-resistance. At last, we tested the effects of rapamycin in the chemoresistance of T-ALL having decreased levels of HIF1 $\alpha$  in hypoxia. We observed that decreased HIF-1 $\alpha$  reversed hypoxia-related drug resistance, as expected from Figure 4D (Figure 5H-I and suppl Figure 5). Adding rapamycin to shHIF-1 $\alpha$  T-ALL treated with vincristine in hypoxia protected leukemic cells from drugs as increased cell recovery was observed compared to the same cells cultured in absence of rapamycin (Figure 5H and suppl Figure 5). Moreover when vincristine was washed away and equal numbers of cells were allowed to grow back during 7 days, only rapamycin-treated shHIF-1 $\alpha$  leukemic cells treated in hypoxia grew again, indicating that rapamycin rescued the sensibility of T-ALL to vincristine in absence of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia (Figure 5I), further establishing a loop between mTOR and HIF-1 $\alpha$  in the hypoxia-mediated chemoresistance of T-ALL. Altogether these results uncover an original link between mTOR and HIF-1 $\alpha$  in hypoxia mediated drug resistance of T-ALL.

## Discussion

Resistance to chemotherapy plays a crucial role in relapse of childhood ALL (29) but the molecular mechanisms responsible for this resistance are poorly understood. In this work, we showed that hypoxia participates in T-ALL chemoresistance. In solid cancers, it is well established that uncontrolled proliferation leads to profound local hypoxia, associated with tumor development, metabolic changes, metastatic spread, modulation of immune response, and increased mortality (30,31). As in solid tumors, increased hypoxia tensions have also been observed during leukemic progression in bone marrow (32). The aim of this work was to learn more to which extent hypoxia impacts T-ALL growth/propagation and what mechanisms are implicated.

In the present study, we show data obtained with short term hypoxia exposure indicating limited growth, enhanced apoptosis and metabolic rewiring. Actually, the length of exposure to hypoxia is an important parameter and we also maintained cultures of T-ALL blasts up to 21 days in hypoxia (data not shown). Contrary to B-ALL (33), we did not observe differential T-ALL response depending on the duration of hypoxia exposure. T-ALL exposure to both short-term and long-term hypoxia leads to cell growth arrest, with recovered leukemic cells retaining an ability to proliferate when returned to higher O<sub>2</sub> levels. These effects were not mediated by an indirect effect of hypoxia on feeder stromal cells which was described in studies where the stromal cells promote the maintenance of HSC (34). Our experiments with the leukemia samples available in the laboratory that are able to proliferate for several weeks without stromal support indicate that hypoxia can directly target the growth of leukemic cells. A previous study showed that leukemia stem cells (LSC) from T-ALL reside in hypoxic niches of the BM (35). Interestingly, such LSC were shown to be dependent on a molecular loop implicating HIF-1 $\alpha$  and WNT/ $\beta$ -catenin both being activated in hypoxia. In consequence, interfering with HIF-1 $\alpha$  or  $\beta$ -catenin expression/activity reduced the frequency of LSC of T-ALL (35). In accordance with these results, when T-ALL were cultured in hypoxia, e.g. in HIF-1 $\alpha$  stabilization conditions, prior to be transplanted in NSG mice, we observed that the tested leukemia had at least conserved LSC activity even though their ex-vivo growth and metabolic activities were severely modified. We have previously observed a similar dormancy status of leukemic cells recovered from adipocyte-enriched BM compared to hematopoietic-enriched BM, indicating such BM niches were chemoresistance' niches (36). However we were unable to establish a causal relationship between those observations,



as transcriptomic analyses did not evidenced any enrichment for a hypoxia signature in T-ALL cells recovered from adipocyte-rich vs –poor BM.

Nevertheless in the present study, we uncover that T-ALL chemoresistance may also depend on hypoxia, and in particular on HIF-1 $\alpha$ , supporting the observation of increased number of LSC in hypoxic niches (35). We indeed show that HIF-1 $\alpha$  slows down T-ALL growth, through increased quiescence of leukemic cells that probably induces drug resistance. In fact, HIF-1 $\alpha$  is overexpressed in many tumors including some hematologic malignancies (37). HIF-1 $\alpha$  can thus be overexpressed in some T-ALL as a consequence of disabling mutations of VHL (38) and it is shown that HIF-1 $\alpha$  inhibitors may be a therapeutic approach in many hemopathies (39,40) without impacting the self-renewal and differentiation of normal HSCs (40). Similarly, in acute promyelocytic leukemia, the use of HIF-1 $\alpha$  antagonistic RNAs confers anti-leukemic activity and prolongs survival of mice. In association with All Transretinoic Acid (ATRA), eradication of leukemia is observed, these compounds being nontoxic for normal HSCs (41). In our study, HIF-1 $\alpha$  KD promotes T-ALL proliferation in hypoxia allowing to enhance their sensitivity to vincristine, commonly used for treatment in this pathology.

We also describe here that mTOR pathway is implicated in T-ALL chemoresistance in relation with HIF-1 $\alpha$ . mTOR is considered a central regulator of cell metabolism since it promotes the synthesis of proteins, lipids and nucleotides, as well as a glycolytic phenotype (42). Since glycolysis is the only reliable source of ATP under the fluctuating oxygen pressures detected in the BM (43), it is not surprising that mTOR interacts with HIF-1 $\alpha$  in T-ALL (28). Indeed, we show that phosphorylation of mTOR, indicative of its activation, is diminished in T-ALL under hypoxia cultures and rapamycin, a well-known inhibiteur of mTOR, mimics the effects of hypoxia, e.g. enhanced quiescence, in T-ALL cultured in normoxia. Moreover, addition of rapamycin during treatment of T-ALL with vincristine in normoxia protects leukemic cells, resulting in enhanced cell recovery after the cessation of drug treatment. These results outline potential adverse effects of using mTOR inhibitors in T-ALL treatment, as proposed in some protocols (44). Indeed, over the years, several small molecules that target the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway have been developed, showing potential therapeutic efficacy in hematological malignancies, alone or in combination with chemotherapeutic drugs (45). However, the effects of mTOR inhibitors may vary depending on the pathology and their use might worsen the development of certain leukemias. For instance, in MLL-driven leukemia, hyper-activation of mTOR pathway causes LSC to enter the cell cycle, compromising their stability and reducing their capacity to generate leukemia

(46). Following on this idea, usage of mTOR inhibitors may therefore promote cell quiescence in this particular leukemia and thereby favor chemoresistance and relapse. From our results, inhibition of mTOR in T-ALL that slower propagation of blasts would thus have interesting anti-leukemic effect at short term. At long term, if molecules such as rapamycin mimic the biological effects of hypoxia, it might induce a significant proportion of blasts to escape drug treatment. Thus, the use of mTOR inhibitors for T-ALL treatment would have long-term adverse effects with a potentially increased risk of relapse from chemoresistant quiescent leukemic cells.

## Methods

### Human and mouse T-ALL

Human T-ALL cell samples were obtained with the informed consent of patients in accordance with the Declaration of Helsinki and the Ethic regulations. Blood and/or bone marrow samples were collected at diagnosis at Hôpital R. Debré and Hôpital A. Trousseau (Paris) and processed as previously described (15). Part of newly diagnosed leukemic cells was injected in immune-deficient mice and part was frozen in Foetal Calf Serum (FCS) containing 10% of Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich). T-ALL samples, all used after xenografting, are described in [Supplementary Table 1](#).

Notch1 intracellular domain 1 (ICN1)-induced mouse 45.2 T-ALL cells (mT-ALL #1), TLX1-induced mouse T-ALL cells (mT-ALL #2) and *NOTCH1*<sup>L1601PAP</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> mouse T-ALL cells (mT-ALL #3) were kindly provided by respectively Dr Ghysdael's (Institut Curie, Orsay, France), Dr Adolfo Ferrando (Institute for Cancer Genetics, New York, USA) and Dr Olivier Bernard (U1170, Villejuif, France).

### Culture conditions

Human T-ALL were co-cultured with MS5 stromal cells transduced or not with pTRIP-ΔU3-EF1α-huDelta-like1 (DL1)-IRES-GFP lentiviral vector (MS5-DL1) as previously described (16). In short, leukemic cells were plated with MS5 or MS5-DL1 cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) in 500 μL of alpha-minimum essential medium (α-MEM, Gibco) containing 10% of FCS, 1% of Penicilline/Streptomycine/L-Glutamine (Gibco), recombinant human stem cell factor (hSCF ; 50 ng/mL), Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-L ; 20 ng/mL) (both from Miltenyi Biotech), IL-7 (10 ng/mL ; Preprotech) and Insulin (20 nM ; Sigma-Aldrich) in 24-well plates and incubated at 37°C in 21%, 3.5% and 1% of O<sub>2</sub> using a hypoxic chamber (PrOox culture chamber BioSpherix Ltd, Redfield, NY, USA). Cells were harvested at indicated time points and further processed. When necessary, equal numbers of leukemic cells were replated on fresh stromal MS5-DL1 feeders in medium freshly renewed every other day.

### Quantification of mitochondrial mass and membrane potential

Mitochondrial mass was determined using 50 nM Mitotracker Green (MTG, M7514, ThermoFisher Scientific) and mitochondrial membrane potential was measured using 100nM TetraMethylRhodamine methyl Ester (TMRE, T669, ThermoFisher Scientific), both following manufacturer instructions. Briefly leukemic cells were incubated with MTG and

TMRE for 30 min at 37°C in their culture medium before analysis. Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 2920, Sigma-AldrichR) was added at 50µM 15 min before the end of the labeling and used as a negative control.

### **Drug treatment *in vitro***

T-ALL co-cultures were set with MD5-DL1 cells during one night in high or low O<sub>2</sub> levels before adding vincristine sulfate (10nM), Dexamethasone (100nM) or Cytarabine (500nM) (all from Sigma-Aldrich) during a 3-days period. Human T-ALL CD45<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup> cells were then harvested and numbered by flow cytometry. Equal number (indicated in figures) of live cells were reseeded with fresh MS5-DL1 cells in fresh medium without drugs during 7 days at 21% O<sub>2</sub> or transplanted in immune deficient mice. Cells growing in secondary cultures were recovered and numbered as detailed before.

### **Mice and leukemic cell transplantation**

NOD/scid/IL-2R $\gamma$  null mice (NSG, originally from The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) were produced in specific pathogen-free animal facilities (CEA, Fontenay-aux-Roses, France). Transplantation of pre-cultured leukemic cells into NSG mice was preceded by an adhesion of cells for 40 min at 37°C to eliminate contaminating MS5-DL1 stromal cells. T-ALL cells were thereafter counted and equal numbers of leukemic cells recovered from different experimental conditions were injected into NSG mice by intravenous route. The number of transplanted cells depended on the experimental settings. Human leukemia development was followed by sampling bone marrow (BM) cells. BM-infiltrating leukemic cell levels were determined by labeling BM cells with anti-hCD45 and anti-hCD7 antibodies and analyses were done using a FACS-Canto (Becton Dickinson). All animal experimentation was done after approval of a local ethical committee, and with the authorization number APAFIS#9458-2017033110277117 from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

### **Flow cytometry**

Absolute number of leukemic cells, proportion of apoptotic cells, cell cycle progression and mTOR pathway activation were measured by flow cytometry using FACS Canto and LSRII cytometers (Becton Dickinson). Data analysis was carried out with FlowJo software. Cells were stained with fluorescein (FITC)-, phycoerythrin (PE)-, PE-cyanin7 (PC7)- or allophycocyanin (APC)-conjugated mouse monoclonal antibodies specific for human

markers. Absolute number of cells was quantified by determining the number of hCD45<sup>+</sup>/hCD7<sup>+</sup> cells in a fraction of the culture multiplied by the total volume of the culture well. Cell apoptosis analysis was done using Annexin V staining, by selecting cells and debris and gating on hCD45<sup>+</sup>/hCD7<sup>+</sup> cells. In short, cells were labeled with anti-CD45 and anti-CD7 antibodies, washed with Annexin V Binding Buffer (1X) (556454, BD Biosciences) before being stained with Annexin V (640941) during 15 minutes at room temperature. Cells were washed and resuspended in Annexin V Binding Buffer.

For cell cycle, cells were stained with anti-CD45-APC and anti-CD7-PC7 antibodies, permeabilized using Cytofix/Cytoperm (554722, BD Biosciences) during 15 minutes minimum at 4°C, washed with Perm/Wash Buffer (554723, BD Biosciences) and labeled with anti-Ki67 antibodies (556027, BD Biosciences) at 4°C during 45 minutes and Hoechst 33342 (H3570, Life Technologies) 10 minutes before the end of incubation. Cells were washed with Perm/Wash Buffer and resuspended in PBS.

mTOR signaling pathway activation was measured on ice using PE anti-mTOR (pS2448, 563489, clone O21-404), PE anti-4EBP1 (pT36/pT45, 560285, clone M31-16) and PE anti-S6 (pS235/pS236, 560433, clone N7-548) antibodies (BD Biosciences). Cells were stained with anti-CD45 antibodies, permeabilized using Cytofix/Cytoperm during 15 minutes minimum at 4°C, washed with Perm/Wash Buffer and labeled with anti-mTOR, anti-4EBP1 or anti-S6 antibodies at 4°C during 30 minutes, washed with Perm/Wash Buffer and resuspended in PBS.

Cell sorting was performed using an Influx cell sorting cytometer (BD Influx system; BD Bioscience). Transduced cells were sorted based on the CD45<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> phenotype.

### **Lentiviral vectors and transduction of T-ALL cells**

HIF-1 $\alpha$  short hairpin RNA (shHIF-1 $\alpha$ ) was cloned in the pTRIP/ $\Delta$ U3-MND-GFP vector and produced as in (Sirven, Mol Therapy, 2001) and shHIF-1 $\alpha$ .2 given by Frédéric Mazurier laboratory was cloned in the pTRIP/ $\Delta$ U3-EF1 $\alpha$ -GFP vector. T-ALL were transduced as in Gerby et al (17).

### **Real-time quantitative RT-PCR**

RNA was extracted from T-ALL cells collected after culture at different O<sub>2</sub> levels with TRIZOL (Life Technologies), cDNA were generated using SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) and were used for real-time quantitative PCR using *Power SYBR®* Green PCR Master Mix (Life Technologies) and 7900HT fast real-time PCR system (Applied

Biosystems). Forward and reverse primer sequences are described in [Supplementary Table 2](#). Data were normalized over  $\beta 2m$  Ct value.

### **Immunofluorescence**

Cells were fixed with cold 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature, then in absolute ethanol for 20 minutes at  $-20^{\circ}\text{C}$  and in PBS for 30 minutes at room temperature. Cells were layered on poly-l-lysine coated slide (Sigma-Aldrich) and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Slides were washed three times in PBS, then incubated in PBS 0.2% Triton (Sigma-Aldrich) for 15 minutes, washed three times in PBS and blocked in PBS 3% BSA 0.2% Tween 20 (Sigma-Aldrich) for 1 hour. Then slides were incubated with primary antibodies diluted in blocking solution (mouse anti-human CD45, BD Biosciences and rabbit anti-human HIF-1 $\alpha$ , Abcam) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ , washed three times in PBS 0.2% Tween 20 followed by staining with the secondary antibodies (goat anti-mouse DyLight 488, Bethyl Laboratories and goat anti-rabbit Alexa Fluor 555, ThermoFisher Scientific) for 1h30 at room temperature and nuclei were stained with DAPI. Slides were mounted with Fluoromount-G (SouthernBiotech), observed using a Leica TCS SP8 MP Confocal Microscope (Leica, Germany) and images were analyzed with ImageJ software.

### **Statistical analyses**

Statistical analysis was performed using Prism software. Values are presented as the mean or median  $\pm$  SEM. Statistical comparisons between conditions were determined using the Friedman nonparametric test, Wilcoxon matched pairs test or Mann-Whitney test. Survival of mice was compared using the log-rank (Mantel-Cox) test. Differences with  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.001$  (\*\*\*) are considered statistically significant.

## Acknowledgments

Mouse work was facilitated by Silvia Vincent-Naulleau and Julien Tilliet from the IRCM/CEA animal facility. We thank Julien Rucci for his technical help during experiments and Paul-Henri Roméo for critically reading the manuscript. The lentivectors were produced thanks to Guillaume Piton and Didier Busso from the CiGex Platform, cell sorting was performed by Nathalie Deschamps at the Flow Cytometry platform and immunofluorescence was done at the Microscopy platform with help from Lamya Ibrah, all in Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Fontenay-aux-Roses, France. This work was supported by INSERM, CEA, Université Paris Diderot, Université Paris Sud, the Association Laurette Fugain and Fondation ARC (équipe labellisée). LF was funded by the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC). The work was started during a period of labeling of the team by LNCC.

## Authorship Contributions

LF designed and performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript. BU and LF performed in vivo experiments. IN supervised the molecular experimental design. JC and SC performed experiments. JC, RH, SP, IN, MLA and FM gave advices during experiments and writing of the manuscript. TL, AP, AB and PB provided patient samples and clinical data. BU and FP coordinated and supervised the study and wrote the paper.

## Disclosure of Conflicts of Interest

The authors declare no competing financial interest.

## References

La mise à jour automatique des citations est désactivée. Pour voir la bibliographie, cliquez sur Actualiser dans l'onglet Zotero.



## Figure Legends

### Figure 1: Hypoxia modulates apoptosis, cell cycle and metabolism in T-ALL.

**(A)** Growth of T-ALL in low and high O<sub>2</sub> levels. Shown are the numbers of leukemic cells after 4 days of culture in normoxia and hypoxia expressed as fold variation compared to number of cells plated at day 0 in contact with MS5-DL1 cells. Every dot is the mean of technical triplicates for one experiment. T-ALL #1 n=6exp, T-ALL #2 n=6exp, T-ALL #3 n=4exp, T-ALL #4 n=3exp and T-ALL #5 n=2exp. **(B)** Apoptosis levels for T-ALL in culture at high and low O<sub>2</sub> levels. Shown are Annexin V+ cells: left histograms are a representative experiment (T-ALL #2) and right plots are fold variation of apoptotic cells relative to control gated on all cells and cellular debris. As in **(A)** mean of triplicates for T-ALL #1, T-ALL #2, T-ALL #3 and T-ALL #4, n=2exp for each T-ALL. **(C)** Cell cycle analysis of T-ALL in high and low O<sub>2</sub> levels. **Upper plots:** Representative plots of Ki67/Hoechst staining of T-ALL #1. **Lower graphs:** Proportion of Ki67+ leukemic cells (left) and proportion of cells in G0, G1, S and G2/M phases (right). Shown are Mean ± SEM of cultures with T-ALL #1 and T-ALL #3, n=6exp. **(D)** Metabolic status of T-ALL in high and low O<sub>2</sub> levels. MTG (up) and TMRE (down) staining of a representative experiment (T-ALL #2) and MFI from T-ALL cultured in hypoxia reported to controls. Every experiment was done in triplicates. T-ALL #1, T-ALL #2, T-ALL #4 and T-ALL #5, n=1exp for each T-ALL except for T-ALL #1 n=2exp. **(E)** Relative mRNA expression levels of HIF-1 $\alpha$ , Glut3, VEGF and CXCR4 genes. Tested on T-ALL #1, T-ALL #2, T-ALL #3 and T-ALL #4, n=9exp. Statistics were done using the Friedman test, p < 0.05 (\*), p < 0.01 (\*\*), or p < 0.001 (\*\*\*)

### Figure 2: Hypoxia impacts T-ALL cell re-growth activity in vitro and in vivo

**(A-B)** Growth of T-ALL after hypoxia cultures have been stopped. **(A)** Leukemic cell numbers of T-ALL pre-cultured in low and high O<sub>2</sub> levels after replating 7 days at 21% of O<sub>2</sub> with MS5-DL1 stromal cells. **(B)** Same except the secondary cultures were maintained during 28 days. Every experiment was done in triplicates. Shown are Mean ± SEM of cultures with each T-ALL. **(C)** Engraftment levels of T-ALL after cultures in low and high O<sub>2</sub> levels. (Left) Representative flow cytometry analysis 8 weeks after transplantation of mouse #1 BM injected with T-ALL #2 pre-cultured in normoxia. (Right) Kinetic of leukemia development in BM after transplantation of 500 cells of T-ALL #2 pre-cultured in normoxia or hypoxia. Shown are percent of leukemic (human CD45+CD7+) cells. **(D)** Survival curves of mice transplanted with 500 leukemic cells isolated from cultures in normoxia or in hypoxia. 4-5

mice/condition. Statistics were determined with the Friedman test and the log-rank (Mantel-Cox) test for mice survival,  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.001$  (\*\*\*)

### **Figure 3: Hypoxia enhances T-ALL chemoresistance**

**(A-B)** Effect of vincristine on T-ALL resistance in high and low O<sub>2</sub>. **(A)** Shown are the numbers of lived cells recovered after treatment during 72 hours with 10 nM (+Vincristine) or without (Ø) vincristine. Mean ± SEM of triplicate cultures are represented. Shown are Mean ± SEM of cultures with T-ALL #1, T-ALL #2, T-ALL #3, T-ALL #4 and T-ALL #5 n=9 experiments. **(B)** Same result is presented in percentage of lived cells after treatment (+Vincristine in (A)) compared to non-treated (Ø in (A)) cells. Every experiment was done in triplicate. Every dot is the mean of those triplicates with T-ALL #1 n=3exp, T-ALL #2 n=5exp, T-ALL #3 n=3exp, T-ALL #4 n=2exp and T-ALL #5 n=1exp. **(C)** Leukemic cell production after 7 days in normoxia without treatment, following T-ALL treatment with vincristine in normoxia or hypoxia. Every experiment was done in triplicates. Shown are Mean ± SEM of cultures with each T-ALL. **(D)** Propagating activity of T-ALL treated ex-vivo with vincristine in high or low O<sub>2</sub> levels. Shown is a kinetic analysis (4, 6 and 8 weeks) of leukemia development in BM after transplantation of 500 leukemic cells of T-ALL #2 recovered from normoxic or hypoxic culture with vincristine treatment, represented in percent of leukemic cells. Left, a representative mouse. Right, analysis of 5 mice/group from T-ALL #2. **(E)** Survival of mice transplanted with 500 cells pre-cultured in normoxia or in hypoxia with vincristine (+Vinc). T-ALL #1, T-ALL #2 and T-ALL #3, 4-5 mice/condition. Statistics were determined using the Friedman test and the log-rank (Mantel-Cox) test for mice survival,  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.001$  (\*\*\*)

### **Figure 4: Implication of HIF-1 $\alpha$ in hypoxia-related T-ALL chemoresistance**

**(A)** Relative mRNA expression of HIF-1 $\alpha$ , Glut3, VEGF and CXCR4 genes in shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL reported to levels measured in shCTL/T-ALL controls. Every dot represents gene levels of one experiment compared to  $\beta$ 2m reporter gene levels. Tested on T-ALL #1, T-ALL #3, T-ALL #5, Jurkat and DND41 cell lines. Shown are results of a total of 8exp. **(B)** Number of shCTL/T-ALL and shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells after 4 days of coculture with MS5-DL1 stromal cells in normoxia or in hypoxia. Data are expressed as fold variation compared to control (shCTL 21%). Tested in triplicate in every experiment. T-ALL #1 n=6exp (**left**) and T-ALL #3 n=2exp (**right**). **(C)** Decreased HIF-1 $\alpha$  modifies T-ALL cycling in hypoxia. Shown is the proportion of shCTL/T-ALL and shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells in G0 phase in normoxia or in

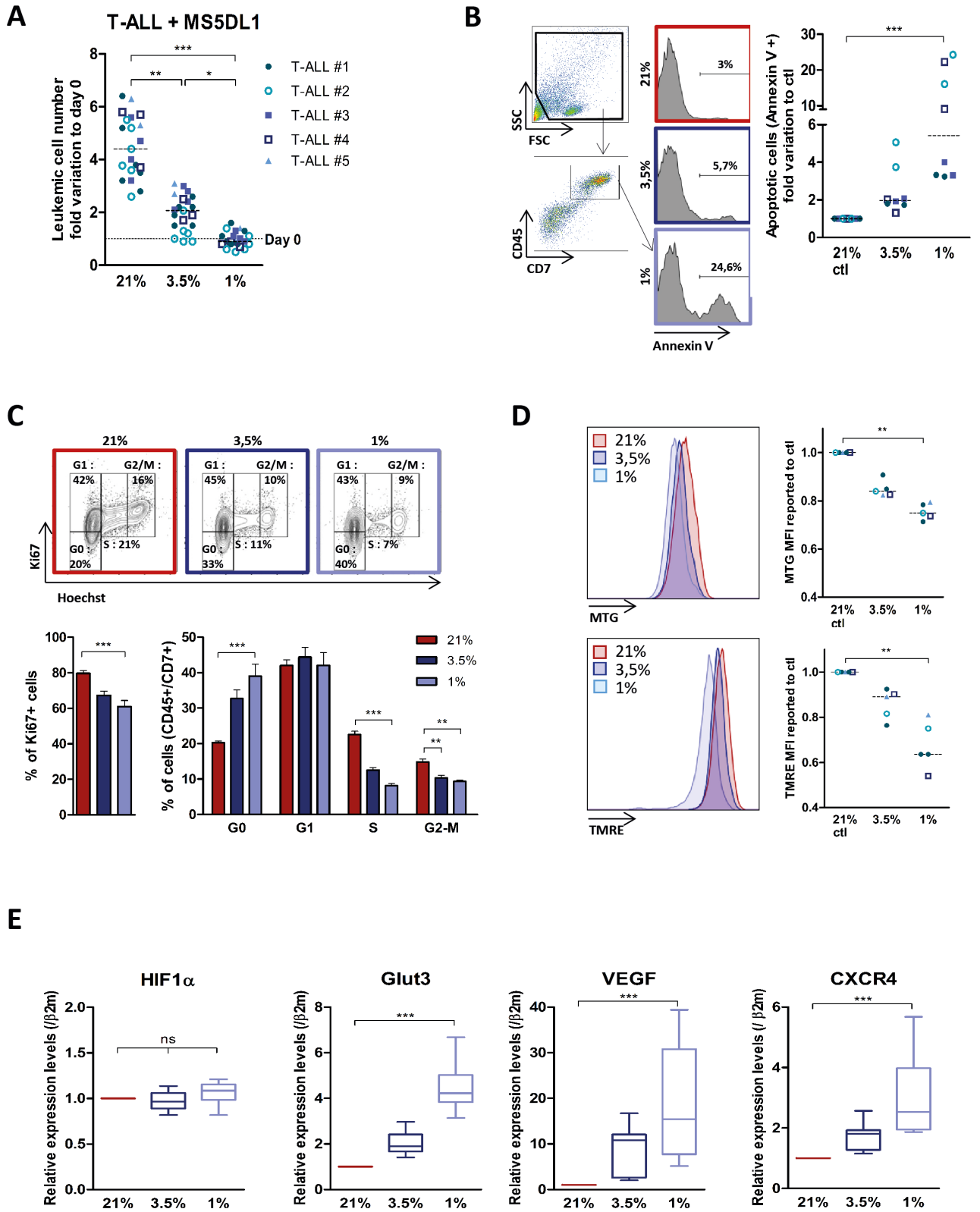
hypoxia. Shown are Mean  $\pm$  SEM of cultures with T-ALL #1 and T-ALL #3, n=4exp. **(D)** Decreased HIF1 $\alpha$  increases chemosensitivity of T-ALL in hypoxia. Shown are the percentages of lived shCTL/T-ALL and shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells recovered after treatment during 72 hours with vincristine compared to non-treated cells. Every experiment was done in triplicate. Shown are Mean  $\pm$  SEM of cultures with T-ALL #1 and T-ALL #3, n=8exp. **(E)** Leukemic cell production after 7 days in normoxia without treatment, following shCTL/T-ALL and shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells treatment with vincristine in normoxia or hypoxia. Shown are Mean  $\pm$  SEM of technical triplicates of one experiment on T-ALL #1. **(F)** Survival of mice transplanted with 1000 shCTL/T-ALL or shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells isolated after cultures in normoxia or in hypoxia in presence of 10nM vincristine. T-ALL #1, 5 mice/condition. Statistics were determined using the Wilcoxon test (**A**, **C**) or Friedman test (**D**, **E**) and the log-rank (Mantel-Cox) test for mice survival,  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.001$  (\*\*\*)

**Figure 5: Relationship between hypoxia, HIF-1 $\alpha$  expression, mTOR activation and chemoresistance in T-ALL**

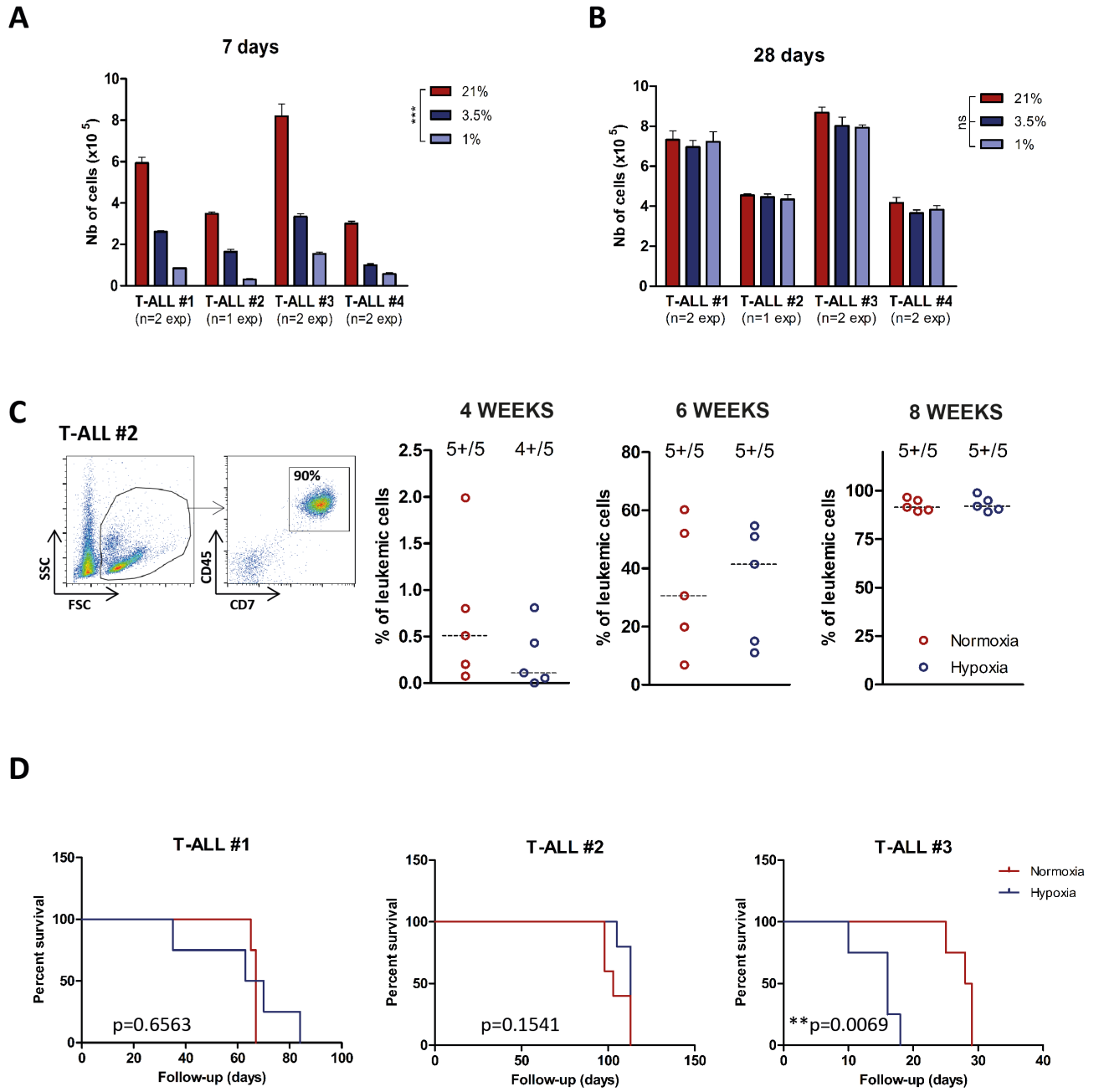
**(A)** Phosphorylation of mTOR (pS2448) and **(B)** of 4EBP1 and S6R. Shown are representative histograms (left plot in 5A) and MFI ratio obtained with leukemic cells harvested from hypoxia compared to normoxia cultures (right in (A) and 2 graphs in (B)). Every dot is the mean of technical triplicates. In (A) T-ALL #1: n=4exp, T-ALL #3: n=4exp and T-ALL #5: n=1exp. In (B) T-ALL#1 2exp, T-ALL#3 n=1exp **(C)** Effect of rapamycin (Rapa) on T-ALL growth in normoxia. Absolute leukemic cell number recovered from every culture condition. The data are expressed as fold variation between the number of cells recovered after 4 days of coculture in presence or absence of rapamycin compared to cells plated at day 0. Every dot is the mean of technical triplicates. T-ALL #1 n=5exp, T-ALL #2 n=3exp, T-ALL #3 n=3exp, T-ALL #4 n=1exp and T-ALL #5 n=3exp. **(D)** Rapamycin decreases T-ALL cell cycle progression. Shown are proportions of leukemic cells in G0, G1, S and G2/M phases, during culture at 21% of O<sub>2</sub> in presence or absence of rapamycin. Shown are Mean  $\pm$  SEM of triplicate cultures performed with T-ALL #1, T-ALL #2 and T-ALL #4, n=6exp. **(E, left)** Rapamycin protects T-ALL from vincristine in normoxia. Shown are the absolute numbers of cells recovered after vincristine treatment in normoxia in presence or absence of rapamycin. **(E, right)** Same results are presented as percentage of lived cells after vincristine treatment in presence (+Rapa) or in absence ( $\emptyset$ ) of rapamycin compared to non-treated cells. Every dot is the mean of technical triplicates from T-ALL #1 n=2exp, T-ALL #2 n=2exp, T-ALL #3 n=3exp and T-ALL #5 n=3exp. **(F)** Leukemic cell number recovered 7

days after replating T-ALL pre-treated with vincristine +/- rapamycin. Shown are Mean  $\pm$  SEM of technical triplicate cultures. **(G)** HIF-1 $\alpha$  impacts on mTOR phosphorylation in low and high O<sub>2</sub> concentration. Left histograms show phosphorylation of mTOR (pS2448) in a representative experiment with T-ALL #1. Right graph shows ratio of MFI from shCTL/T-ALL or shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells cultured in hypoxia compared to those cultured in normoxia. Every dot is the mean of technical triplicates obtained with T-ALL #1 n=2exp and T-ALL #3 n=1exp. Statistics were determined using the Friedman test (**A**), Wilcoxon test (**B**, **C**, **D**, **E**, **G**) or Mann-Whitney test (**F**) p < 0.05 (\*), p < 0.01 (\*\*), or p < 0.001 (\*\*\*). **(H)** *Left panel*, shown are the percentages of lived shCTL/T-ALL and shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells recovered after treatment during 72 hours in hypoxia with vincristine in presence (+Rapa) or in absence ( $\emptyset$ ) of rapamycin compared to non-treated cells. **(I)** Leukemic cell production after 7 days in normoxia without treatment, following *left panel* T-ALL.

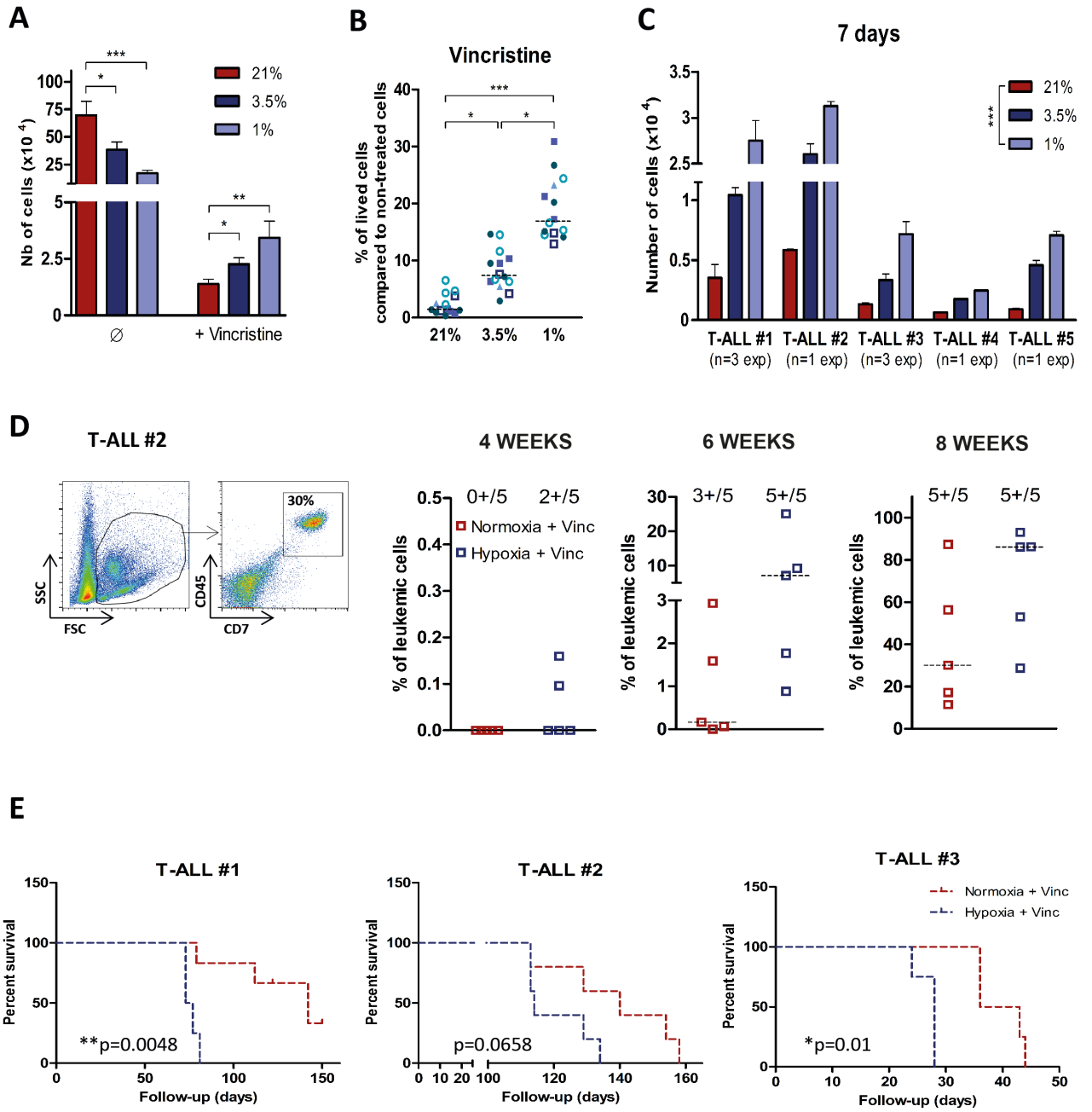
**Figure 1**



**Figure 2**

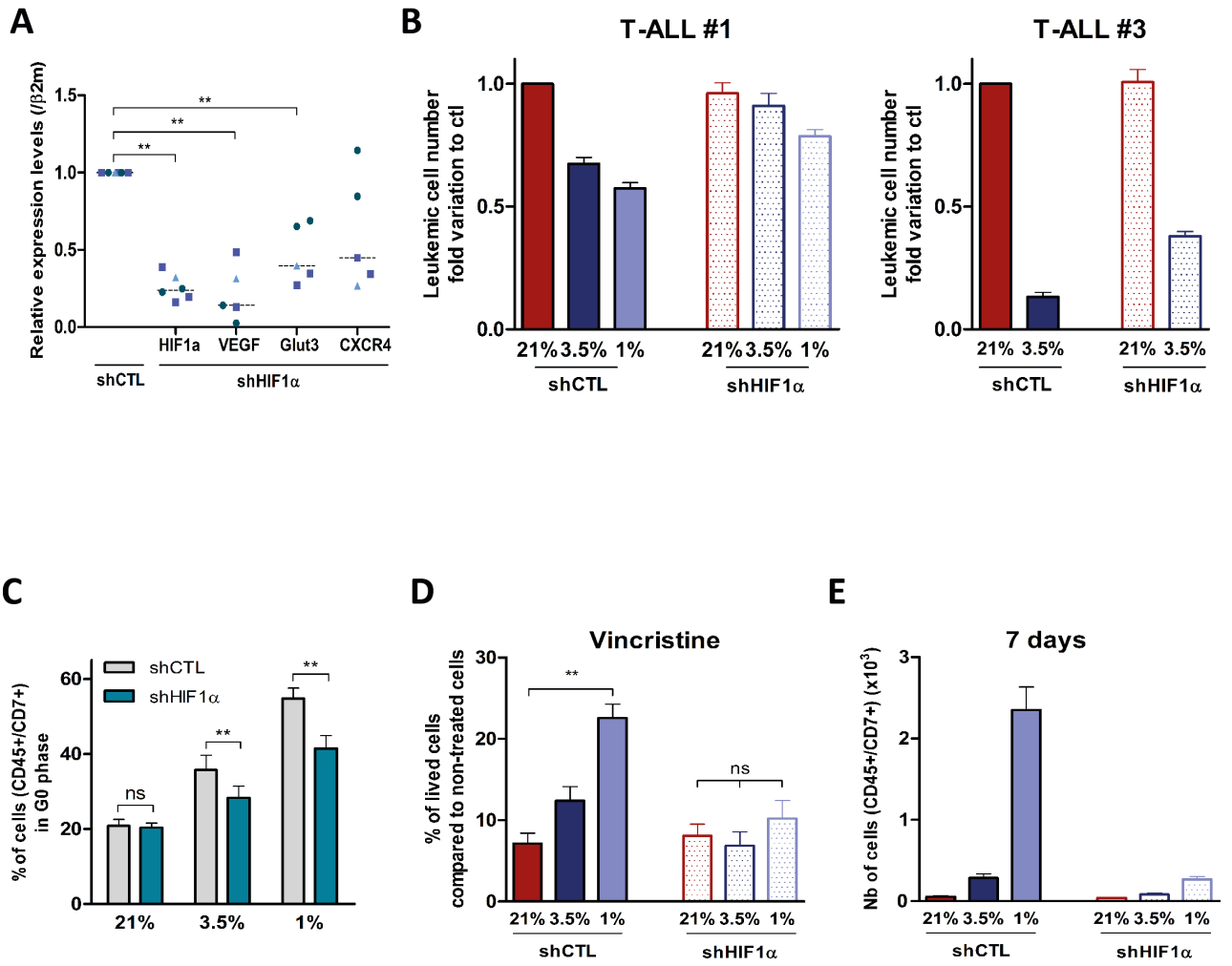


**Figure 3**

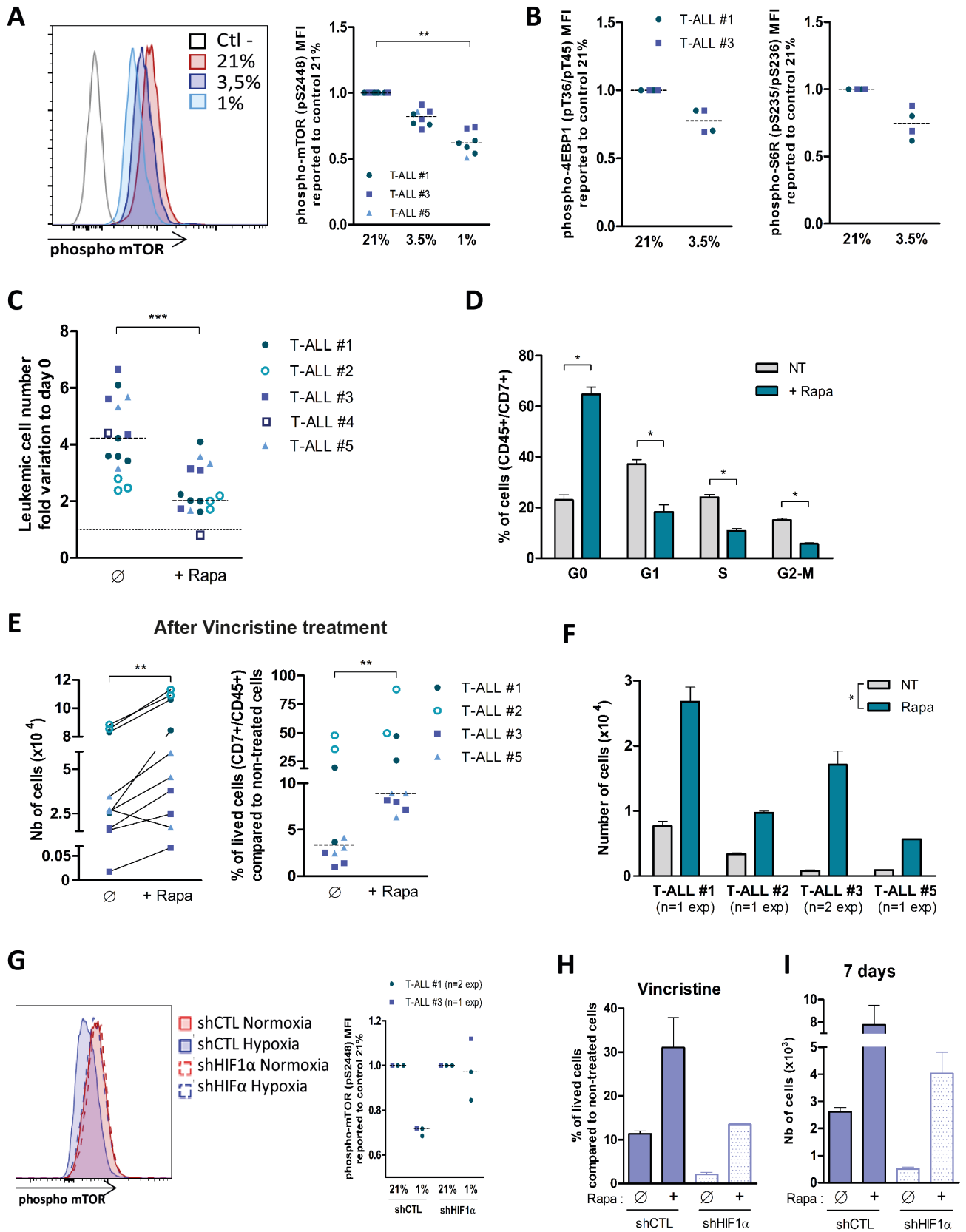




**Figure 4**



**Figure 5**



## Homeobox protein TLX3 activates miR-125b expression to promote T-cell acute lymphoblastic leukemia

Laurent Renou,<sup>1-4</sup> Pierre-Yves Boelle,<sup>5</sup> Caroline Deswarte,<sup>6</sup> Salvatore Spicuglia,<sup>7</sup> Aissa Benyoucef,<sup>1-4</sup> Julien Calvo,<sup>1-4</sup> Benjamin Uzan,<sup>1-4</sup> Mohamed Belhocine,<sup>7</sup> Agata Cieslak,<sup>8,9</sup> Judith Landman-Parker,<sup>6</sup> Andre Baruchel,<sup>10</sup> Vahid Asnafi,<sup>8,9</sup> Françoise Pflumio,<sup>1-4,\*</sup> Paola Ballerini,<sup>6,\*</sup> and Irina Naguibneva<sup>1-4,\*</sup>

<sup>1</sup>Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, Laboratoire des Cellules Souches Hématopoïétiques et Leucémiques, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Unité Mixte de Recherche (UMR) 967 Stabilité génomique, cellules souches et radiations, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>2</sup>INSERM U967, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>3</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>4</sup>Université Paris-Sud, UMR 967, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>5</sup>Département d'Informatique Médicale, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, Paris, France; <sup>6</sup>Service d'Hématologie Pédiatrique, Hôpital A. Trousseau, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France; <sup>7</sup>INSERM U1090, Technological Advances for Genomics and Clinics and Aix-Marseille University, UMR1090, Marseille, France; <sup>8</sup>Institut Necker-Enfants Malades, Université Paris Descartes Sorbonne Cité, INSERM U1151, Paris, France; <sup>9</sup>Laboratory of Onco-Hematology, Hôpital Necker Enfants-Malades, AP-HP, Paris, France; and <sup>10</sup>Service d'Hématologie Pédiatrique, Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris, France

### Key Points

- TLX3 transactivates *LINC00478*, the host gene of oncogenic miR-125b-2 in T-ALL.
- TLX3 and miR-125b contribute to the differentiation arrest and the expansion of transformed T cells.

The oncogenic mechanisms driven by aberrantly expressed transcription factors in T-cell acute leukemia (T-ALL) are still elusive. MicroRNAs (miRNAs) play an important role in normal development and pathologies. Here, we examined the expression of 738 miRNA species in 41 newly diagnosed pediatric T-ALLs and in human thymus-derived cells. We found that expression of 2 clustered miRNAs, miR-125b/99a, peaks in primitive T cells and is upregulated in the T leukemia homeobox 3 (TLX3)-positive subtype of T-ALL. Using loss- and gain-of-function approaches, we established functional relationships between TLX3 and miR-125b. Both TLX3 and miR-125b support *in vitro* cell growth and *in vivo* invasiveness of T-ALL. Besides, ectopic expression of TLX3 or miR-125b in human hematopoietic progenitor cells enhances production of T-cell progenitors and favors their accumulation at immature stages of T-cell development resembling the differentiation arrest observed in TLX3 T-ALL. Ectopic miR-125b also remarkably accelerated leukemia in a xenograft model, suggesting that miR-125b is an important mediator of the TLX3-mediated transformation program that takes place in immature T-cell progenitors. Mechanistically, TLX3-mediated activation of miR-125b may impact T-cell differentiation in part via repression of *Ets1* and *CBFβ* genes, 2 regulators of T-lineage. Finally, we established that TLX3 directly regulates miR-125b production through binding and transactivation of *LINC00478*, a long noncoding RNA gene, which is the host of miR-99a/Let-7c/miR-125b. Altogether, our results reveal an original functional link between TLX3 and oncogenic miR-125b in T-ALL development.

### Introduction

T-cell acute lymphoblastic leukemias (T-ALLs) are aggressive hematologic tumors resulting from the malignant transformation of T-cell progenitors. T-ALLs are characterized by multiple genetic lesions including constitutive activation of the NOTCH1 signaling pathway,<sup>1</sup> inactivation of tumor suppressor genes (*PTEN*, *NF1*, and *PHF6*), gene amplification (*NUP214-ABL1*, *MYB*), and inappropriate expression of transcription factors (*TAL1*, *LMO1*, *LMO2*, *LYL1*, *TLX1*, and *TLX3*).<sup>2</sup> Several of these features are unique and mutually exclusive, thereby endowing T-ALL subgroups with distinct biological

Submitted 3 February 2017; accepted 27 March 2017. DOI 10.1182/bloodadvances.2017005538.

\*FP, P.B., and I.N. are joint supervisors.

The full-text version of this article contains a data supplement.

© 2017 by The American Society of Hematology

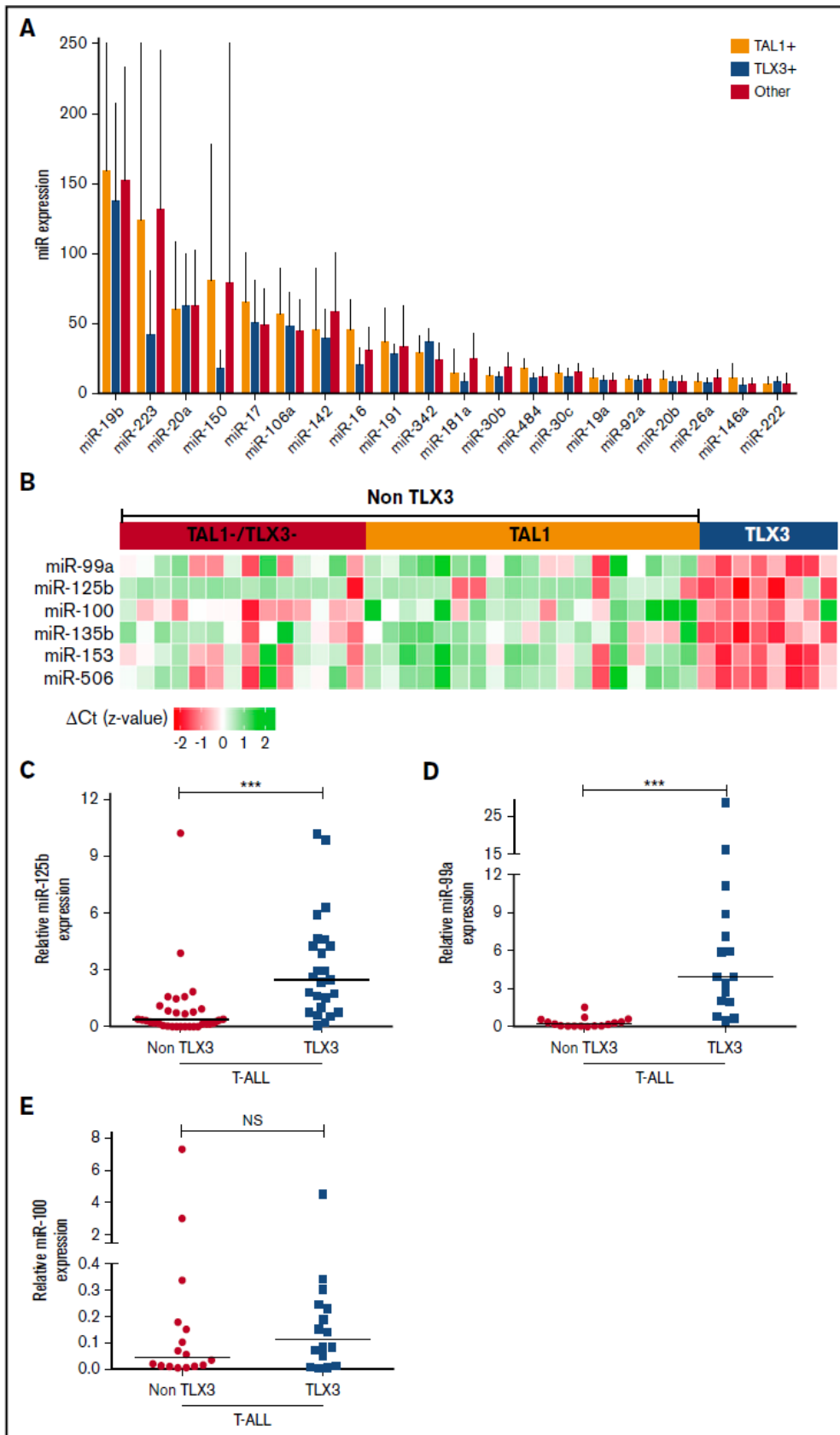


Figure 1.



properties. T leukemia homeobox 3 (TLX3)-rearranged T-ALL cells phenotypically resemble thymocytes arrested at the early cortical stage.<sup>3-5</sup> TLX3 is overexpressed in up to 25% of pediatric T-ALL and is rare in adult T-ALL. The orphan homeobox *TLX3* gene is involved in the regulation of embryonic brain development.<sup>6</sup> Aberrant expression of TLX3 in T-ALL arises commonly from the t(5; 14)(q35; q32) translocation which places this gene under the influence of enhancer regions downstream of the *BCL11B* gene. Alternative rearrangements of the 5q35 locus affecting expression of TLX3 have also been reported.<sup>7-9</sup> How TLX3 contributes to leukemia development is still elusive. Recent studies suggest that TLX3 as well as its homolog TLX1 may be recruited by the ETS1 transcription factor to the core of the T-cell receptor  $\alpha$  (TCR $\alpha$ ) enhancer (E $\alpha$ ) and repress its activity. This repression incites the epigenetic silencing of the TCR $\alpha$  locus and maturation arrest.<sup>10</sup> TLX1/TLX3-rearranged T-ALLs are highly related in terms of global gene expression and tend to cluster together, away from other T-ALL subtypes.<sup>4,5,11</sup> Moreover, TLX1 and TLX3 have been shown to be master regulators of an oncogenic transcriptional circuit centered around RUNX1, a main target of their inhibitory action.<sup>12</sup>

T-cell development is dynamically regulated by microRNAs (miRNAs).<sup>13,14</sup> Combinatorial action of miRNAs optimizes the expression patterns of protein-coding genes and so provides a mechanism for fine-tuning signaling pathways and main cell functions.<sup>15</sup> Genetic lesions in human leukemia often perturb miRNA expression, unleashing their tumor suppressor or oncogenic activity.<sup>16-19</sup> In T-ALL, a small subset of 5 oncogenic miRNAs was found to cooperatively downregulate tumor suppressor genes like *P TEN* and *FBXW7*. These miRNAs are highly expressed across different cytogenetic groups of T-ALL, and their ectopic expression accelerates development of leukemia in a NOTCH-induced T-ALL mouse model.<sup>20</sup> The alternative group of tumor suppressor miRNAs is downregulated in T-ALL upon MYC activation. Their loss relieves the high expression of B-MYB and HPB1 oncogenic proteins and thus promotes the leukemia onset in mice.<sup>21</sup>

We hypothesized that miRNA deregulation could be triggered by abnormal expression of transcription factors frequently activated in pediatric leukemia and so contribute to oncogenic transformation. Comparative expression profiling of 738 miRNAs in a panel of 41 newly diagnosed pediatric T-ALLs and in 7 human thymus-derived cell subsets revealed the increased expression of 2 clustered miRNAs: miR-125b and miR-99a in T-ALL with deregulated expression of TLX3 in accordance with previous work.<sup>20</sup> We found that TLX3 directly transactivates the expression of long intergenic nonprotein coding RNA 478 (*LINC00478*), the host gene of the miR-99a/let-7c/125b-2 cluster, an original result in comparison with earlier reported miRNA profiling. Furthermore, we provide convincing evidence that TLX3-mediated overexpression of oncogenic miR-125b in early T-cell progenitors impairs normal T-cell development inducing proliferation and differentiation arrest of immature T cells.

## Methods

### T-ALL samples

T-ALL cells were collected at diagnosis upon informed consent of patient's relatives in accordance with the Declaration of Helsinki and national ethics guidelines. The INSERM ethical committee (IRB000003888) approved the project (evaluation number 13-105-1). Primary T-ALL cells were cultured in contact with mouse MS5/DL1 stromal cells as described<sup>22</sup> (see details in supplemental Methods).

### Normal human T-cell subsets

Pieces of postnatal thymi were obtained from 5-day- to 4-year-old children undergoing corrective cardiac surgery (Service de Chirurgie Cardiaque Pédiatrique, Hôpital Necker, Paris, France) with the parental informed consent and according to the French Ethical Committee's regulations. Lymphocyte subsets were purified by sorting on an INFLUX cell sorter (BD Biosciences) with combinations of surface markers (supplemental Methods).

### miRNA profiling

Total RNA was isolated using mirVana or mirAqueous RNA isolation kits (Ambion and Life Technologies) following the standard protocols for specific miRNA retention. RNA integrity was estimated by capillary electrophoresis using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) and samples with RNA integrity number >8 were used in TaqMan low-density array (TLDA) analysis. miRNA profiling was performed according to the manufacturers' protocol (Applied Biosystems and Life Technologies).<sup>23</sup> miRNA data processing and statistics are detailed in supplemental Methods. Individual miRNAs were validated by the single miRCURY LNA microRNA PCR system (Exiqon).

### Human T-cell differentiation

Cord blood (CB) samples were collected from healthy newborns with the informed written consents of the mothers. All experiments were done in accordance with the ethics evaluation committee of INSERM (IRB000003888, FWA00005831) and with collaborative protocols signed with the Hôpital Antoine Beclère (Clamart, France) and Clinique des Noriets (Vitry-sur-Seine, France). CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-low</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CD90<sup>-</sup> hematopoietic progenitor cells (HPCs) were sorted, transduced with lentiviral vectors, and cocultured with MS5/DL1 cells as described.<sup>24</sup> Cell counting and immunophenotyping of culture-derived human T cells were performed every week starting from day 21 using FACSCalibur and LSR-II flow cytometers (BD) (supplemental Methods).

Human CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-low</sup> HPCs were also transduced with control (CTRL) (70% transduction efficiency), TLX3/OE (42%), and 125b/OE (42%) vectors and injected into NOD.Cg-Prkdcscid

**Figure 1. miRNA expression in pediatric T-ALL.** (A) Twenty most abundantly expressed miRNAs in different cytogenetic subgroups of 41 T-ALL clinical specimens as assessed by TLDA and normalized to the RNU48 expression in a given sample ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). miRNAs are ranked by expression levels (given as percentage of RNU48 expression). (B) Heatmap of miRNAs differentially expressed in 3 cytogenetic subgroups of T-ALL. Normalized expressions ( $\Delta Ct$  z-values) were color-coded by a gradient from green (underexpressed) to red (overexpressed) relative to the mean (ANOVA adjusted *P* values: .005 [miR-135a], .005 [miR-125b], .013 [miR-100], .03 [miR-506], .03 [miR-99a], .04 [miR-153]). (C-E) Comparison of miR-125b, miR-99a, and miR-100 levels in TLX3 vs non-TLX3 T-ALL samples by R-Q-PCR (Exiqon). miRNA expression is normalized to RNU44; levels in DP T cells are used as calibrator ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): (C) miR-125b (n = 25 vs n = 33), (D) miR-99a (n = 16 vs n = 16), and (E) miR-100 (n = 16 vs n = 16). \*\*\**P* < .001, Mann-Whitney *U* test. Ct, cycle threshold; NS, not significant.

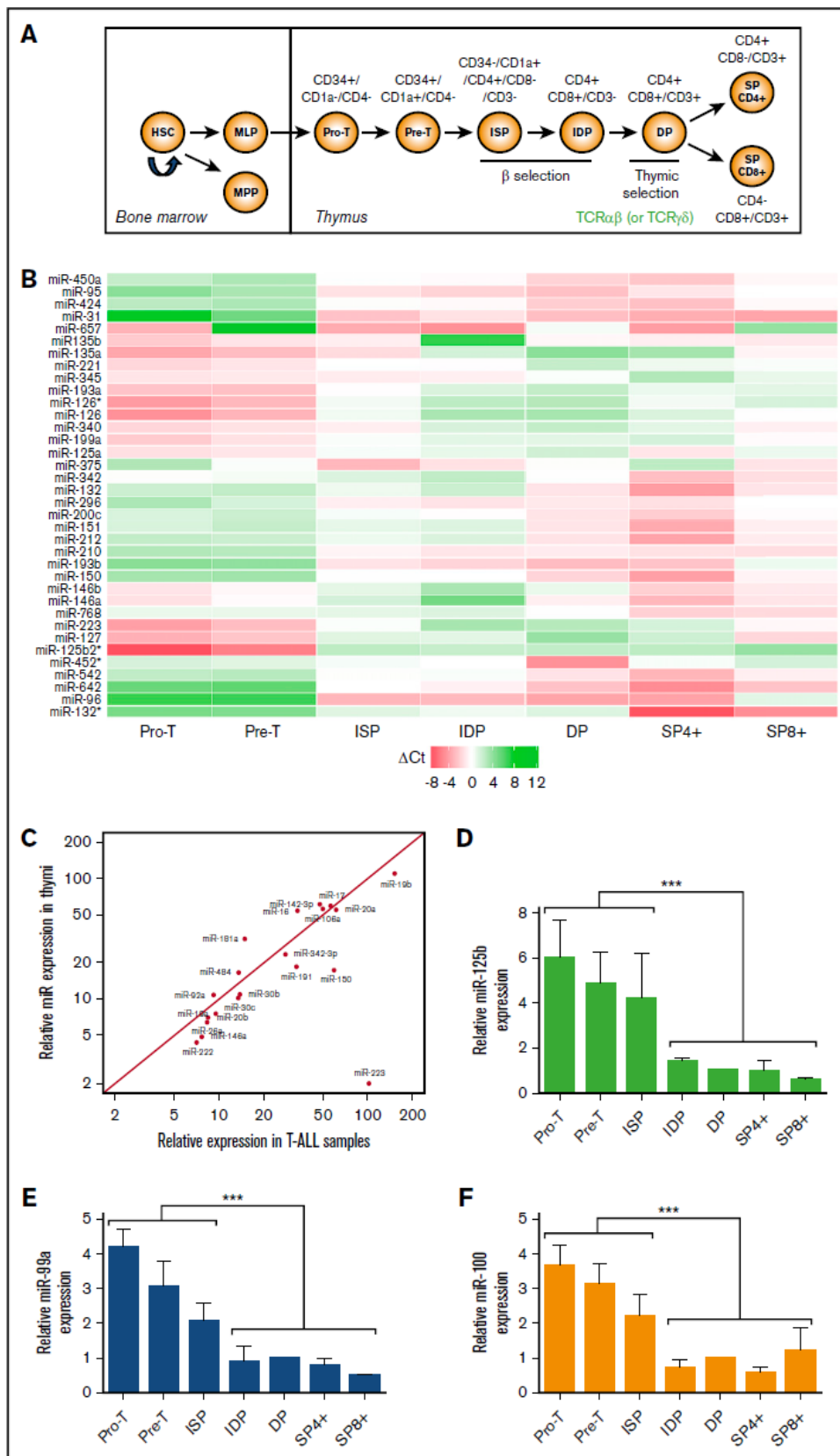


Figure 2.



Il2rgtm1WjllSzJ (NSG) mice recipients ( $5 \times 10^4$  cells per mouse). Mouse bone marrow (BM), spleen, and thymus were recovered 90 days after transplantation; cells were numbered and immunophenotyped using anti-human specific antibodies (supplemental Methods).

### Lentiviral vector transduction

Constructs and generation of lentiviral supernatants are detailed in supplemental Methods and in Amsellem et al<sup>25</sup> and Gerby et al<sup>26</sup>; T-ALL samples and T-ALL cell lines were transduced with G/IL-7SUx envelope-pseudotyped vectors. Human CB-derived HPCs were transduced with VSV/G-pseudotyped vectors.<sup>27</sup>

### Chromatin immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments on DND41, HPB, and Jurkat cell lines or T-ALL samples were performed according to the Agilent protocol (version 10.0), using anti-TLX3 (H-55 X; Santa Cruz Biotechnology), anti-H3ac (06-599; Millipore), normal rabbit and mouse immunoglobulin Gs (IgGs) (sc-2027 and sc-2025; Santa Cruz Biotechnology). ChIP sequencing (ChIP-seq) of a TLX3<sup>+</sup> T-ALL sample was performed using a customized antibody<sup>10</sup>; sequencing and data proceedings are detailed in supplemental Methods.

## Results

### miRNA profiling shows increased levels of miR-125b in pediatric TLX3 T-ALL

We first assessed the expression of 738 miRNAs in a panel of 41 newly diagnosed pediatric T-ALLs by high-throughput real-time quantitative polymerase chain reaction (R-Q-PCR) analysis (TLDA). Blast cell specimens were divided into 3 molecular groups: (1) a TAL1-expressing group ("TAL1";  $n = 19$ ) which included samples with *SIL-TAL1* deletions ( $n = 10$ ), *TAL1* rearrangements with either *TCRA/D* or *TCRB* loci ( $n = 3$ ), and *TAL1* overexpression in the absence of the above chromosomal alterations ( $n = 6$ ); (2) a "TLX3"-expressing group ( $n = 8$ ); and (3) an "other" group ( $n = 14$ ) which was characterized by the lack of both *TAL1* and *TLX3* expression and the absence of *CALM-AF10*, *inv(7)*, *TLX1*, *LMO1/2* rearrangements or overexpression (supplemental Tables 1-2). The number of expressed miRNAs per sample ranged between 407 and 541, which corresponded to 51% and 70% of the miRNA species available on the TLDA cards. Overall, expression of 532 miRNAs was detected in >75% of samples (supplemental Table 3) and considered in further analysis. Some of them were highly expressed in all T-ALL samples (Figure 1A). No statistical difference in the expression of the "top 20" most abundant miRNAs was found among the 3 *TAL1*/*TLX3*/other oncogenic groups. When analyzing all miRNAs, analysis of variance (ANOVA) and pairwise analyses revealed a small subset of miRNAs significantly upregulated in the

TLX3 T-ALL. This miRNA subset comprised clustered miR-125b, miR-99a, miR-100, and nonclustered miR-153, miR-135a, and miR-506 (Figure 1B). Relative expression of the TLX3-associated miR-125b, miR-99a, and miR-100 was substantially higher compared with miR-135a, miR-153, and miR-506 (supplemental Table 3). Overexpression of miR-125b and miR-99a, but not miR-100 in TLX3 T-ALL was further confirmed by R-Q-PCR analysis including an independent series of primary T-ALLs (Figure 1C-E).

### miRNA expression in sorted T-cell progenitors

We next performed miRNA profiling of 7 thymus-derived cell subsets corresponding to different stages of human T-cell development: from immature double-negative (DN) including pro-T and pre-T, immature single-positive (ISP), immature double-positive (IDP), mature double-positive (DP), and mature single-positive (SP4) and (SP8) thymocytes<sup>28</sup> (Figure 2A). Comparison of miRNA profiles of these fractions permitted identification of 36 miRNAs whose expression changed significantly (false discovery rate < 0.05, ANOVA test; LIMMA package) throughout T-cell maturation (Figure 2B; supplemental Table 4). Among these most variable miRNAs, only 4 overlapped with a set of highly expressed miRNAs found in T-ALL analysis, namely miR-223, miR-150, miR-146a, and miR-342. Relative expression of miR-223 peaked in early thymic precursors and decreased in cortical thymocytes, whereas expression of miR-150, miR-146a, and miR-342 increased along the differentiation. On the other hand, 17 of the 20 most abundant miRNAs in T-ALL were expressed through all stages of normal T-cell development at levels similar to those observed in T-ALL except miR-223, showing 50-fold higher expression in T-ALL (Figure 2C).

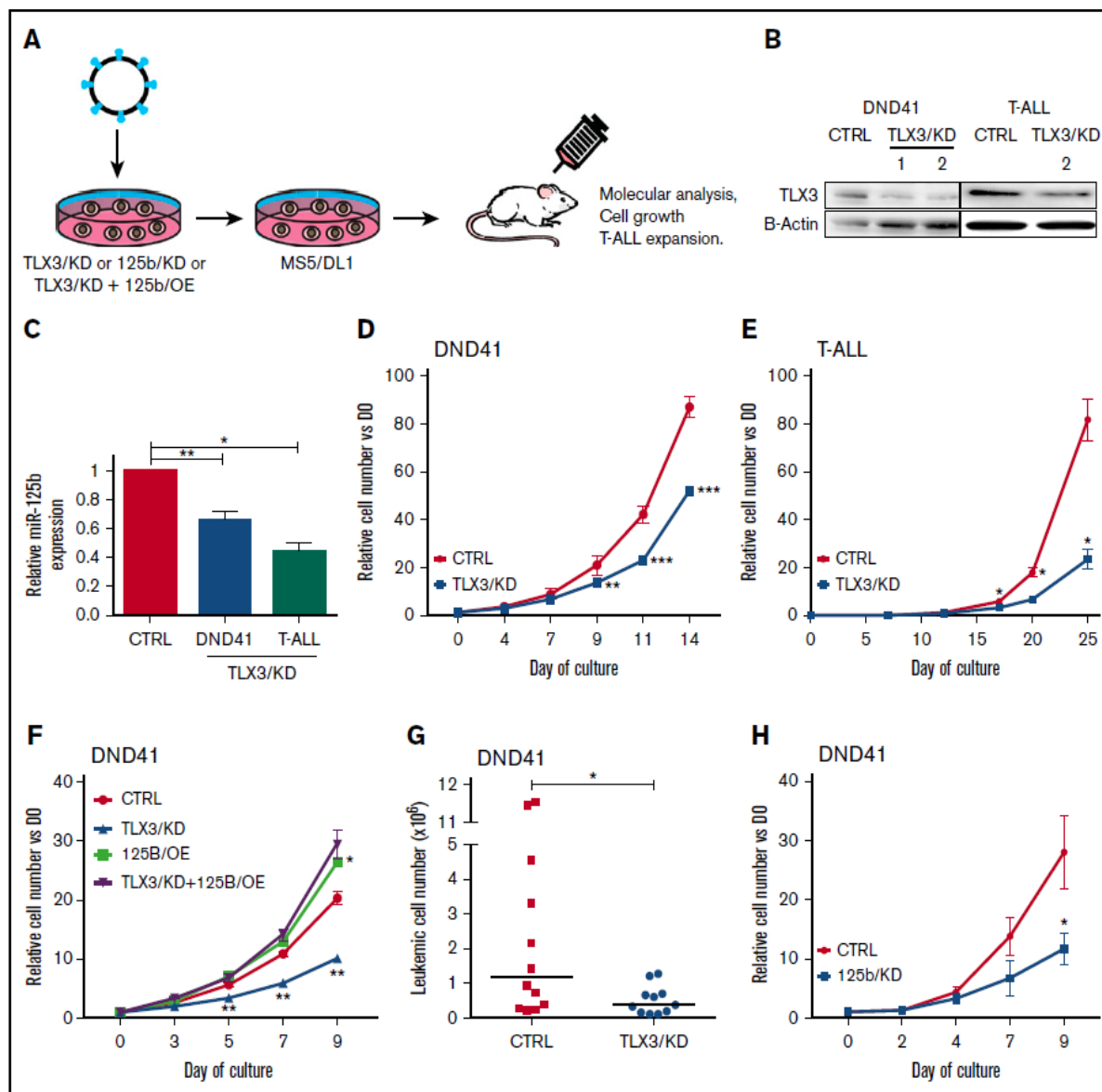
Interestingly, expression levels of miR-125b, miR-99a, and miR-100 peaked in pro-T, pre-T, and ISP cells and decreased throughout further T-cell maturation, reaching the lowest values in surface CD3<sup>+</sup> cells (Figure 2D-F). We hypothesized that the high expression of miR-125b and miR-99a observed in TLX3 T-ALL may interfere with normal T-cell differentiation and contribute to T-ALL development. Recently described oncogenic features of miR-125b in ALL<sup>29,30</sup> and the major impact of miR-125b and miR-99a on hematopoietic stem cell growth<sup>31</sup> prompted us to focus our study on the functional relationship between miR125b and TLX3 in T-ALL.

### TLX3 knockdown reduces miR-125b levels and impairs T-ALL growth

We first tested the effect of TLX3 knockdown (TLX3/KD) on miR-125b expression in the DND41 cell line and in 3 primary TLX3 T-ALLs (Figure 3A). Two short hairpin RNA (shRNA) vectors efficiently decreased TLX3 protein levels in transduced cells by 60% to 70% (Figure 3B) in correlation with a nearly

**Figure 2. miRNA expression during human T-cell development.** miR-125b is highly expressed at early immature stages. (A) Schematic representation of human T-cell development. Human thymocytes obtained from healthy donors were sorted according to established cell surface markers: immature DN including pro-T (CD34<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup>) and pre-T (CD34<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup>/CD1a<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>), ISP (CD34<sup>-</sup>/CD1a<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>/CD3<sup>-</sup>), IDP (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>), mature DP (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>), and mature SP (SP4: CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>/CD3<sup>+</sup> and SP8: CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>) thymocytes. (B) Heatmap of the 36 most differentially expressed miRNAs at 7 sequential stages of T-cell development ( $n = 3$ ). Shown are miRNA expression levels relative to the average of the row. The white color corresponds to the mean expression across all stages ( $\Delta Ct = 0$ ). Red and green colors correspond, respectively, to overexpression ( $\Delta Ct < 0$ ) and underexpression ( $\Delta Ct > 0$ ). (C) Comparative expression of the 20 most abundant miRNAs in T-ALLs and in thymi. miRNA expression is given as percentage of RNU48 control. (D-F) Relative miRNA expression in T-cell subsets ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Levels in DP cells were used as calibrator ( $n = 3$ ) (D) miR-125b; (E) miR-99a; (F) miR-100. \*\*\* $P < .001$ , Mann-Whitney  $U$  test. HSC, hematopoietic stem cell; MLP, multilymphoid progenitor; MPP, multipotent progenitor.

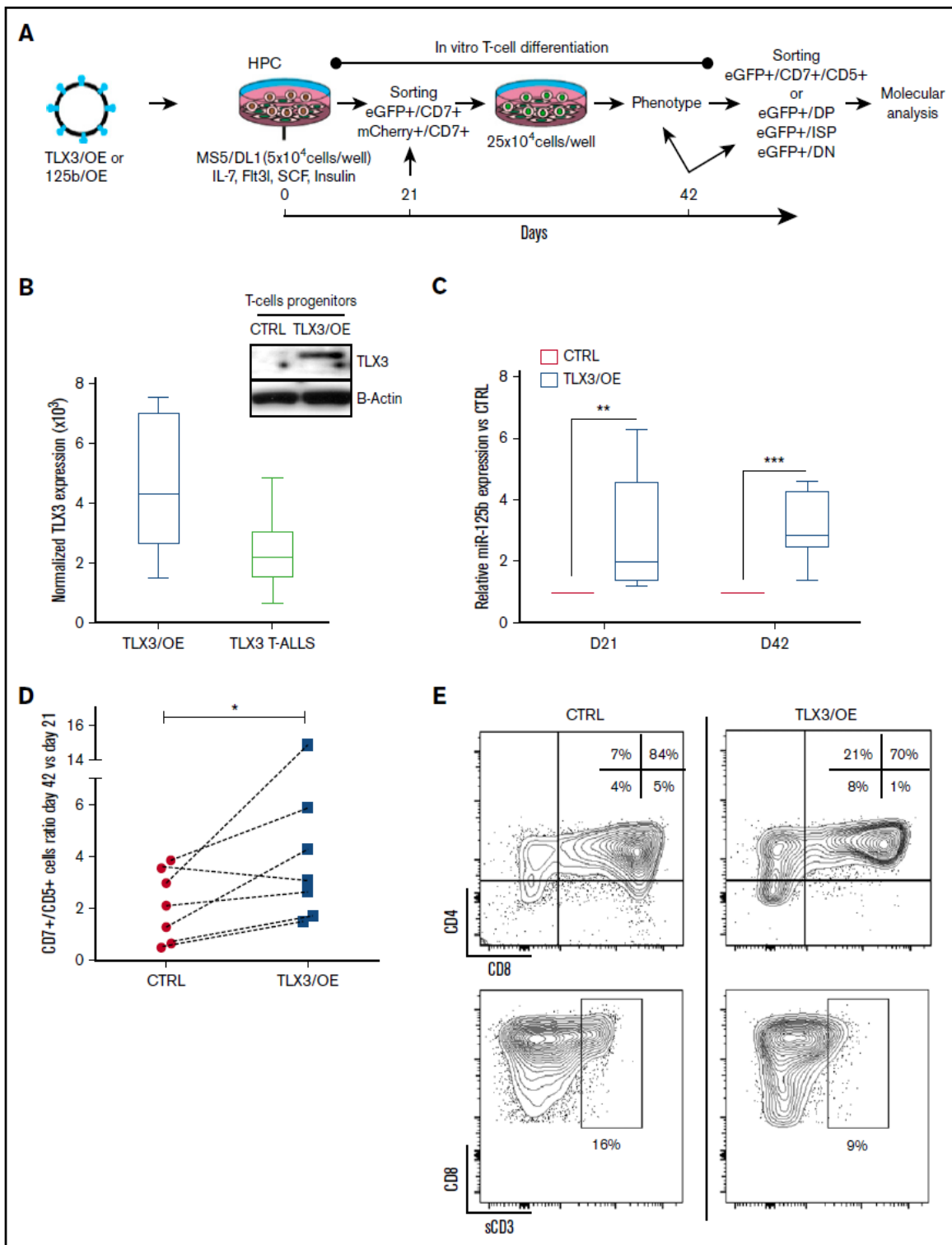




**Figure 3. TLX3 knockdown correlates with reduced expression of miR-125b and slows proliferation of T-ALL.** (A) Flowchart of TLX3/KD and 125b/KD experiments. A lentivirus-based system was used to downregulate TLX3 or miR-125b in T-ALL cells. CTRL eGFP and mCherry vectors express, respectively, irrelevant shRNA and "sponge" RNA. Sorted transduced T-ALL cells were cocultured with MS5-DL1 stromal cells. The DND41 cell line was grown in stroma-free standard culture conditions for functional and molecular analyses. (B) Western blot analysis of TLX3 silencing. Two TLX3/KD vectors efficiently silenced TLX3 protein in DND41 cells (left panel), of which one (right panel) expressed TLX3 in primary T-ALL. (C) miR-125b expression in TLX3/KD vs CTRL in DND41 cells and in primary T-ALLs. Results of R-Q-PCR analyses performed in (n = 7) independent experiments for DND41 cells and in (n = 3) independent T-ALL samples. (D-E) In vitro cell growth of TLX3/KD cells: (D) DND41 cell line (n = 3) and (E) primary T-ALL (n = 1) made with 4 technical replicates. Data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of 3 experiments for DND41 and of 4 technical replicates for T-ALL. (F) Ectopic expression of miR-125b rescues growth inhibitory effect of TLX3 knockdown. DND41 cells were doubly transduced in the following conditions: (CTRL): CTRL/eGFP and CTRL/mCherry that do not express any miRNA; (TLX3/KD): CTRL/mCherry and TLX3/KD(eGFP); (125b/OE): CTRL/eGFP and 125b/OE(mCherry); (TLX3/KD+125b/OE): TLX3/KD(eGFP) and 125b/OE (mCherry). Transduced cells were sorted and cultured in standard conditions. GFP/mCherry DP cells were enumerated by flow cytometer; (n = 3) independent transduction experiments. (G) Reduced leukemic propagation of TLX3/KD DND41 cells in mice. Shown are engraftment levels in spleens 6 weeks after transplantation. Bars represent median values (n = 2). (H) In vitro growth of 125b/KD DND41 cells (n = 3). Data represent the mean value  $\pm$  SEM. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ , Mann-Whitney *U* test.

twofold decrease in miR-125b levels in leukemic cells (Figure 3C). Functionally, TLX3/KD slowed down the in vitro growth of DND41 or T-ALL cells (Figure 3D-E), a defect that was rescued by ectopic expression of miR-125b (125b/OE) (Figure 3F). Impaired tumorigenic behavior of TLX3/KD DND41 cells was also observed in vivo. Six weeks after transplant, 10 times fewer leukemic cells were found

in spleens of TLX3/KD DND41-transplanted mice compared with CTRL (Figure 3G) in parallel to lower spleen weight (supplemental Figure 1A). Leukemic BM infiltration was not modified (supplemental Figure 1B), suggesting a delay of extramedullary leukemia propagation or that our mouse analyses were done too late in the leukemic progression. Finally, knocking down miR-125b (125b/KD)



**Figure 4. Overexpression of TLX3 induces miR-125b expression and correlates with expansion and differentiation arrest of T-cell progenitors.** (A) Design of gain-of-function experiments. Human HPCs isolated from UCB were transduced with lentiviral expression vectors encoding, respectively, TLX3 (TLX3/OE) or eGFP alone (CTRL), miR-125b (125b/OE), or mCherry alone (CTRL) and cocultured with the murine MS5 stromal cells constitutively expressing human NOTCH ligand  $\Delta$ -like 1 (MS5/DL1) in the presence of a cytokine cocktail. (CD7<sup>+</sup>/eGFP<sup>+</sup>) or (CD7<sup>+</sup>/mCherry<sup>+</sup>) T/NK progenitors were sorted and replated at day 21 of coculture with MS5/DL1 stromal cells. Thereafter, differentiation was weekly monitored and HPC-derived T cells were fractionated at day 42. (B) Left, Comparison of TLX3 expression in transduced T cells and in primary TLX3 T-ALL by R-Q-PCR (n = 8). Shown are absolute copy numbers of TLX3 normalized to housekeeping gene ABL quantified by using external DNA dilution standards. Top right, Western blot analysis

(supplemental Figure 2) in DND41 T-ALL cells phenocopied the *in vitro* growth inhibitory effect observed with TLX3/KD (Figure 3H). Altogether, these results show a correlation between TLX3 and miR125b expression in T-ALL, both factors being implicated in the control of leukemic cell growth.

### Overexpression of TLX3 or miR125b induces expansion of normal T cells and blocks differentiation at immature stages *in vitro* and *in vivo*

We next ectopically expressed TLX3 (TLX3/OE) during *in vitro* differentiation of normal human T cells and tested the possible interplay between TLX3 and miR-125b expression. Gene-modified human CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-low</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CD90<sup>-</sup> HPCs were induced to differentiate *in vitro*<sup>24</sup> and monitored during 42 days (Figure 4A). Molecular analyses of total CD7<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>/enhanced green fluorescent protein-positive (eGFP<sup>+</sup>) T cells and DN, ISP, and DP T-cell subsets consistently demonstrated an association between ectopic TLX3 expression and concomitant upregulation of miR-125b and miR-99a, and, to a lesser extent, low abundant miR-100, in newly generated T cells (Figure 4B-C and not shown).

*In vitro* human T-cell development proceeds through a first wave of T-cell production (21-28 days) followed by a regular decrease in T-cell numbers (28-42 days). In TLX3/OE conditions, the late drop in T-cell numbers was not recurrently observed (supplemental Figure 3A). TLX3/OE in HPCs allowed twofold to fourfold more CD7<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> T cells to be kept between 21 and 42 days of culture compared with CTRL cells (Figure 4D). Phenotype analysis of newly produced T cells revealed a higher percentage of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> ISP and a significant decrease of mature CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> DP subsets in TLX3/OE conditions (Figure 4E; supplemental Figure 3B), indicating that TLX3 not only maintains T-cell production during cell culturing but also impacts their differentiation. Similar expansion of early T cells was observed when ectopic miR-125b (125b/OE) was delivered into HPCs instead of TLX3 (Figure 5A-B). We found low but significant accumulation of immature DN progenitors as well as a significant decrease of cell surface CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP cells (Figure 5C; supplemental Figure 4A). The blocking stage of 125b/OE T cells did not strictly coincide with TLX3/OE conditions in which T-cell differentiation was stopped at the early cortical stage close to  $\beta$ -selection but both severely impacted CD3 surface expression. It should be noted that the phenotypes of TLX3/OE and 125b/OE T cells resembled the different TLX3 T-ALL blasts stuck at the immature cortical stages, extending from pro-T to IDP.<sup>5</sup>

The effects of TLX3/OE and miR125b/OE on T-cell differentiation were also tested *in vivo* using transplantation of transduced human CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> progenitor/stem cells into NSG mice. The results confirm that high miR125b increases cell proliferation (supplemental Figure 4B) and modifies the ratio of newly generated T cells. IDP cells especially were significantly enhanced at the expense of the DP cells (Figure 5D-E). Importantly, surface CD3 expression was decreased by enhanced miR125b expression as observed *in vitro* (Figure 5C). Intriguingly, although the control and miR125b-expressing cells did

engraft and develop into human T cells in NSG mice, TLX3/OE CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-low</sup> cells did not engraft the mouse BM, spleen, and thymus. These results show that TLX3, which is not expressed in normal immature progenitors, somehow interferes with the human hematopoiesis process in those conditions.

Altogether, these results support our hypothesis that oncogenic protein TLX3 and miR-125b both contribute to the development of a pre-leukemic T-cell state by sustaining T-cell production and blocking normal differentiation.

### miR-125b enhances leukemia development in T-ALL xenograft

Forced expression of TLX3 in 2 negative cell lines (PEER and Jurkat), and in mature cortical SIL-TAL1 rearranged primary T-ALL (hereafter M106), did not result in miR-125b induction (supplemental Figure 5). Assuming that TLX3 may operate at an earlier T-cell development stage in immature cortical TLX3 T-ALL compared with mature TAL1 T-ALL, we bypassed TLX3 and enforced miR-125b expression in M106 T-ALL. Leukemia propagation *in vivo* was studied using (1:1) competitive transplantation of mCherry<sup>+</sup> 125b/OE T-ALL cells with nontransduced wild-type or eGFP<sup>+</sup> CTRL cells (Figure 5F-G). We observed that leukemia development was enhanced and skewed toward 125b/OE cells that overgrew wild-type or CTRL/eGFP<sup>+</sup> cells. Indeed, mice transplanted with 125b/OE leukemia cells contained non-randomly distributed transduced blasts compared with control mice (Figure 5H-I). Importantly, the median survival time was shorter for 125b/OE T-ALL mouse recipients compared with CTRLs (Figure 5J). This strong oncogenic potential of miR-125b was further confirmed in additional experiments using 2 other 125b/OE TAL1 T-ALLs (supplemental Figure 6). Although these results do not provide information in the context of TLX3, they further outline the strong oncogenic potential of miR125b in human T-ALL.

### ETS1 and CBF $\beta$ expression inversely correlates with TLX3 and miR125b

Given the fact that both 125b/OE and TLX3/OE block human T-cell differentiation and that TLX3 T-ALLs exhibit a predominantly immature phenotype, we looked for candidate target proteins involved in T-cell differentiation. Transcription factor ETS1 is a known miR-125b target in human invasive breast cancer and it is an essential regulator of the activity of the TCR $\alpha$  enhancer and the rearrangement of the TCR $\alpha$  locus.<sup>10</sup> The core-binding factor  $\beta$  (CBF $\beta$ ) is another miR125b target in hematopoietic cells.<sup>32</sup> It takes part in RUNX1-CBF $\beta$  complexes regulating TCR $\beta$  rearrangement and  $\beta$ -selection of developing T cells. We observed that ETS1 as well as CBF $\beta$  were downregulated in TLX3/OE and in 125b/OE HPC-derived T cells and upregulated in TLX3/KD DND41 cells and primary T-ALLs (Figure 6A-D). We also found significantly lower expression levels of ETS1 and CBF $\beta$  in TLX3 T-ALL specimens compared with non-TLX3 T-ALLs (Figure 6E-F). The inverse correlation between TLX3 and ETS1 or CBF $\beta$  levels, 2 miR-125b

**Figure 4. (continued)** illustrating TLX3 protein expression in sorted CD7<sup>+</sup>/eGFP<sup>+</sup> T cells at day 21. (C) miR-125b expression levels in TLX3/OE vs CTRL CD7<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> T cells measured at day 21 (N = 5) and 42 (N = 7) of differentiation. Bar represents medians. \*\*\*P < .001, \*\*P < .01, Mann-Whitney U test. (D) TLX3 induces proliferation of T-cell progenitors. Ratios of T-cell numbers at day 42 vs day 21 obtained in 7 independent experiments. \*P < .05, Wilcoxon test. (E) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) data from a representative experiment at day 42 of culture are shown. Proportions of T-cell fractions are given relative to gated eGFP<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> T cells. IL, interleukin; sCD3, soluble CD3; SCF, stem cell factor.



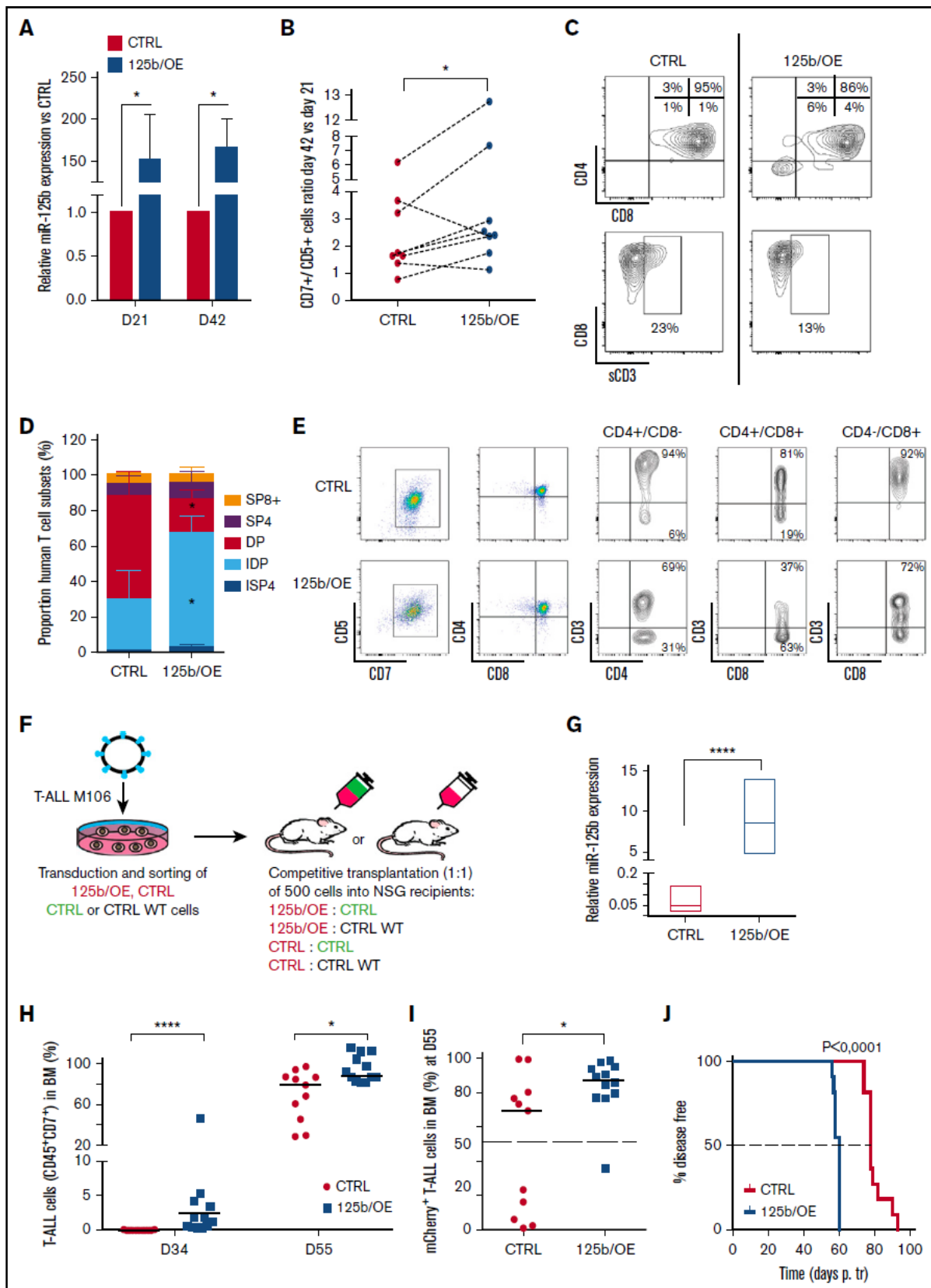


Figure 5.

target genes, supports our hypothesis that miR-125b takes part in T-cell differentiation arrest caused by TLX3.

### TLX3 binds and transactivates *LINC00478*, the host gene of miR-125b-2

Coordinated expression of TLX3 and miR125b suggests that TLX3 may be directly involved in miR-125b regulation. As mature miR-125b-1 and miR-125b-2 have identical sequences, we tested TLX3 binding to regulatory regions near genomic loci encoding 2 paralogous miR clusters: *MIR100/LET-7A/MIR125B-1* and *MIR99A/LET-7C/MIR125B-2* on the corresponding 11 and 21 chromosomes. ChIP analysis of primary T-ALL (hereafter M126) coupled to deep sequencing (ChIP-seq) showed the presence of 2 peaks of TLX3 binding in the locus encoding *LINC00478*, a predicted host gene of miR-99a/let-7c/miR-125b-2 (Figure 7A). Of note, TLX3 binding was not detected in the vicinity of the genetic locus harboring *MIR100/LET7a/MIR125B1* and overlapping the *MIR100HG* gene (supplemental Figure 7). Interestingly, 1 of the TLX3-binding regions on chromosome 21 maps inside of the *LINC00478* gene, near the transcription start site (TSS) of its shorter transcript (+1.3 kb) and the second one (+29 kb) is located in the second intron of the same transcript. Both TLX3-binding sites were validated by ChIP-Q-PCR analysis of blasts obtained from 6 diagnosed TLX3 T-ALL patients as well as from TLX3-expressing DND41 and HPB cell lines. These binding sites were not detected in the non-TLX3 Jurkat cell line and T-ALL M106 (Figure 7B). The enrichments of 2 TLX3-binding regions in T-ALL were of similar order of magnitude as the enrichment of a well-characterized TCR $\alpha$  enhancer-associated sequence,<sup>10</sup> used as a positive control in ChIP experiments (supplemental Figure 8). Interestingly, in DND41 cells, both genomic regions were also enriched with histone H3K4me3 and H3K27ac marks, indicative of an active chromatin state and promoter and enhancer elements (Figure 7A and ENCODE data). These observations were confirmed upon ChIP analysis of 6 TLX3 T-ALLs and 2 cell lines, whereas no active chromatin state of the *LINC00478* locus was found in non-TLX3 T-ALLs and Jurkat cells (Figure 7C). Two fragments of the +1.3-kb binding region were cloned in the pGL3 promoter (SV40) vector (supplemental Figure 9A). Both fragments increased the activity of the heterologous promoter in the presence of ectopic TLX3 in 293T cells (Figure 7D). MiR-99a, let-7, and miR-125b-2 sequences overlap with the last introns of annotated *LINC00478* transcripts having different TSSs and alternative splicing isoforms

(supplemental Figure 9B). In agreement with our hypothesis, 2 *LINC00478* transcripts were expressed at significantly higher levels in TLX3 T-ALLs compared with the non-TLX3 T-ALLs (Figure 7E-F) and in newly produced TLX3/OE T cells compared with CTRL T cells (Figure 7G-H). As mentioned in "Overexpression of TLX3 or miR125b induces expansion of normal T cells and blocks differentiation at immature stages in vitro and in vivo," mature miR-125b and miR-99a were induced in TLX3/OE HPC-derived T cells while expression of miR-100 mapping to the chromosome 11 was considerably weaker. Accordingly, analysis of publicly available RNA-seq data obtained from 2 independent cohorts of T-ALL patients<sup>33,34</sup> showed significantly higher levels of the *LINC00478* transcript in TLX3<sup>+</sup> than in TLX3<sup>-</sup> T-ALL (supplemental Figure 10), whereas *MIR100HG* expression is restricted to normal thymus cells. Taken together, our results indicate that TLX3 transcriptionally regulates the production of miRNAs, including miR125b, encoded in the intron of *LINC00478* in T-ALL.

### Discussion

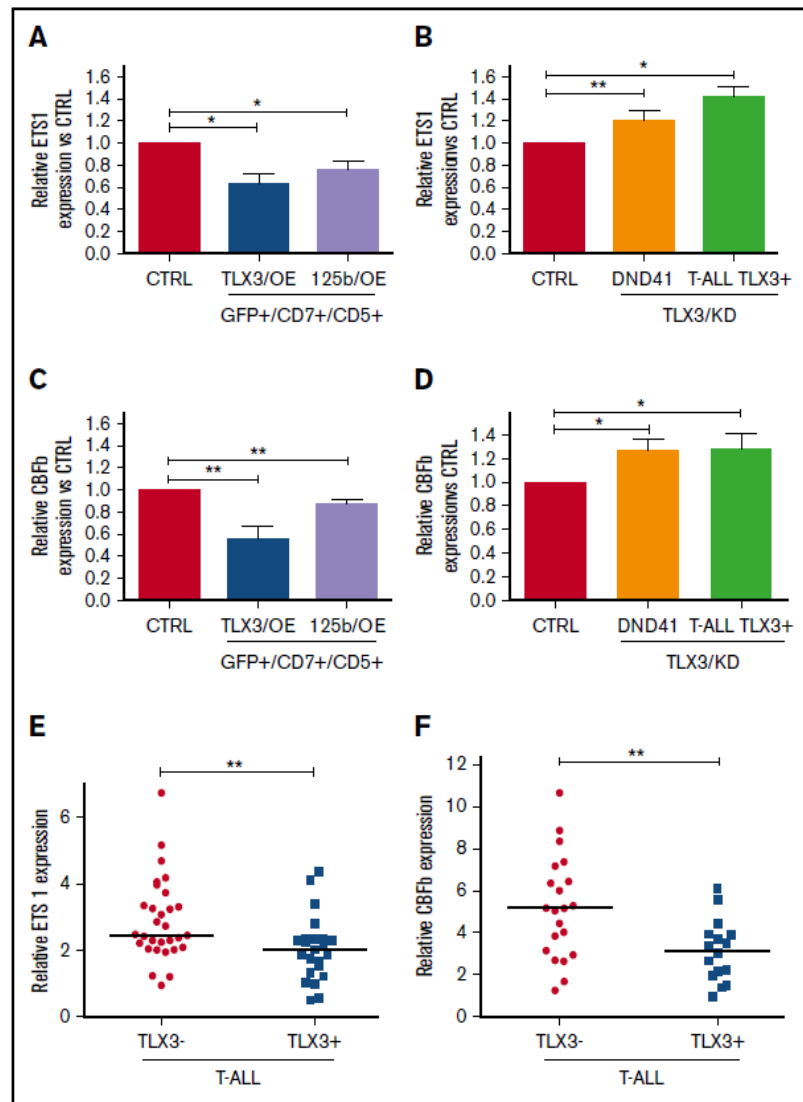
Here, we characterized miRNA expression patterns in pediatric T-ALLs and compared them with the most variable miRNAs detected throughout human T-cell maturation. Nine of the 20 most abundant miRNAs we detected were previously reported as highly expressed in T-ALLs and 5 of them are known regulators of tumor suppressor genes involved in the pathogenesis of T-ALL. In particular, high expression of miR-223 is found in all T-ALL specimens in comparison with normal T-cell precursors. Downregulation of miR-223 target protein E3-ligase FBXW7 and stabilization of c-MYC, MYB, and NOTCH1 oncoproteins have been previously proposed as a part of the oncogenic network in T-ALL.<sup>20</sup> Our results thus consolidate established links between miRNAs and T-ALL development while extending miRnome analysis to pediatric T-ALLs. We also provide highly accurate miRNA profiling of early T-cell precursors during 7 specific maturation stages, including uncharacterized pro-T, pre-T, and ISP cell subsets and uncover the 36 most variable miRNAs that distinguish the different T-cell maturation stages.

In pairwise comparison of the miRNA signatures of the 3 cytogenetic T-ALL groups, miR-125b and miR-99a segregated with TLX3 expression. Taking into account that elevated expression of miR-125b was previously observed but not explored in TLX3/TLX1 T-ALL,<sup>35</sup> and that enforced constitutive overexpression of miR125b in mice induces

**Figure 5. Ectopic expression of miR-125b in HPCs mimics the effects of TLX3 on T-cell differentiation.** Sorted human HPCs were transduced with either miR-125b/OE or CTRL mCherry-traceable vectors. T-cell differentiation was followed as described in Figure 4A. (A) Relative miR-125b expression at days 21 (N = 3) and 42 (N = 5) in miR-125b/OE cells compared with CTRL cells. \**P* < .05, Mann-Whitney *U* test. (B) miR-125b/OE enhances T-cell growth. Cumulative T-cell numbers at day 42 compared with day 21 of culture for miR-125b/OE and CTRL cells (n = 8). \**P* < .05, Wilcoxon test. (C) miR-125b/OE induces accumulation of immature DN cells and blocks sCD3 acquisition by DP cells. Shown are the data from the representative experiment at day 42. Proportions of T-cell fractions are relative to gated mCherry<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> T cells. (D-E) Human T-cell development in mouse xenograft model. Sorted human HPCs were transduced with either miR-125b/OE or CTRL mCherry-traceable vectors and IV injected into NSG recipients. Mice were sacrificed at day 90 posttransplantation. (D) Proportion of ISP4, IDP, DP, SP4, and SP8 populations recovered from total thymi was estimated within the mCherry<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> compartment (n = 3). \**P* < .05, multiple Student *t* test. (E) Shown are the representative plots; 1 mouse per group. Proportions are given relative to gated CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>; CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> fractions. (F) Flowchart of leukemia competitive transplantation experiments. Sorted T-ALL (M106) infected cells (mCherry<sup>+</sup>) expressing or not miR-125b were mixed at a 1:1 ratio with sorted control (eGFP<sup>+</sup>) or sorted wild-type (WT) cell populations and 500 cells were transplanted into NSG recipients. The hosts were monitored for T-ALL development by BM analysis. (G) Relative miR-125b expression (R-Q-PCR), normalized to RNU44 (2<sup>-ΔΔCt</sup>), in M106 T-ALL blasts yielded from BM of recipient mice at sacrifice (n = 4 for CTRL; n = 3 for 125b/OE). (H) T-ALL cell expansion in periphery assessed by CD45<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup> cells in BM at 2 time points. The percentage of CD45<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup> cells was measured gating on live cells. (I) Percentage of (mCherry<sup>+</sup>) CD45<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup> T-ALL cells in BM was measured at day 55. The dashed line indicates the percentage of mCherry<sup>+</sup> cells (50%) at the day of injection. (H-I) CTRL (n = 11); 125b/OE (n = 12). (J) Kaplan-Meier survival plot depicting accelerated leukemia onset in the mouse recipients with ectopic expression of miR-125b. Death points of the recipients were recorded when found dead or moribund. The dashed line indicates median survival time. Data: (G-I) \*\*\**P* < .0001; \**P* < .05, Mann-Whitney *U* test; (J) Mantel-Cox test.

**Figure 6. miR-125b regulates ETS1 and CBFβ genes critical for T-cell differentiation.**

(A-D) ETS1 and CBFβ expression negatively correlates with TLX3 and miR-125b expression in T-ALLs and T-cell progenitors. (A) Relative ETS1 messenger RNA (mRNA) levels in TLX3/OE (n = 6) and miR-125b/OE (n = 7) HPC-derived T cells at day 42 of culture. (B) Relative ETS1 mRNA levels in TLX3/KD DND41 cell line (n = 19) and primary T-ALL TLX3<sup>+</sup> (n = 3). (C) Relative CBFβ mRNA levels in TLX3/OE (n = 3) and miR-125b/OE (n = 7) HPC-derived T cells at day 42 of culture. (D) Relative CBFβ mRNA levels in TLX3/KD DND41 cell line (n = 4) and primary T-ALL TLX3<sup>+</sup> (n = 5). (E-F) ETS1 (E) and CBFβ (F) levels in TLX3<sup>-</sup> compared with TLX3<sup>+</sup> T-ALLs (respectively, n = 30 vs n = 20 for ETS1 and n = 21 vs n = 16 for CBFβ). Shown are relative mRNA expressions normalized to ABL housekeeping gene (*2<sup>-ΔCt</sup>*). (A-F) Data are presented as mean ± SEM of values. \**P* < .05; \*\**P* < .01, Mann-Whitney *U* test.



3 types of neoplasms including T-ALL,<sup>29,30,36</sup> we investigated the functional relationships between miR-125b and TLX3. We found that miR-125b expression levels in TLX3 T-ALL are as high as in early cortical thymocytes from the pro-T to ISP stages of differentiation where TCRβ gene rearrangement, pre-TCR surface expression, and extensive cell expansion take place. miR-125b expression drops substantially in normal IDP, DP, SP4, and SP8 thymocytes, suggesting that miR-125b levels of TLX3 T-ALL mirror the differentiation arrest at the immature cortical stage reported for this pediatric T-ALL subgroup.<sup>10</sup> Relative miR-125b levels in TLX3 T-ALL blasts are up to 10 times higher than in normal DP progenitors and the growth rate of TLX3 T-ALL depends on the miR-125b expression.

miR-125b is transcribed from 2 chromosomal loci, 11q23 (hsa-miR-125b-1) and 21q21 (hsa-miR-125b-2). Genetic rearrangements of both loci are involved in the development of leukemia. *MIR125b-1* is targeted by t(11;14)(q24; q32) and t(2;11)(p21; q23-q24) translocations in B-lymphoid and myeloid malignancies, respectively.<sup>17,18,37</sup> Upregulation of miR-125b-2 linked to structural aberrations of chromosome 21 was observed in megakaryocytic

leukemia associated with Down syndrome<sup>38</sup> and in childhood ETV/RUNX1 ALL.<sup>39,40</sup> In the case of the t(11;14) B-ALL, inappropriate *MIR125b-1* expression is controlled by immunoglobulin heavy chain (*IgH*) regulatory elements.<sup>18,37</sup> In myelodysplasia and acute myeloid leukemia (AML), mechanisms of *MIR125B1* activation are not understood.<sup>17</sup> Published genetic analyses of TLX3 T-ALL did not describe rearrangements of chromosomes 11 and 21 with breakpoints close to *MIR125B1* and *MIR125B2* loci.<sup>41</sup> Comparative genomic hybridization analysis of 12 TLX3 T-ALL from our cohort did not detect copy-number variations of the loci (data not shown). These data argued for direct transcriptional TLX3-mediated miR-125b regulation, further supported by the fact that upregulation and downregulation of TLX3 caused coordinated changes in miR-125b expression. Our data demonstrate that intronic miR-99a/let-7c/miR-125b-2 are processed from the *LINC00478* transcript. Three common TSSs for the miR-99a, let-7c, and miR-125b-2 tricistronic region were previously predicted<sup>42</sup> and recently confirmed in megakaryoblastic cell lines.<sup>43</sup> Interestingly, the homeobox transcription factor HOXA10 and its cofactor



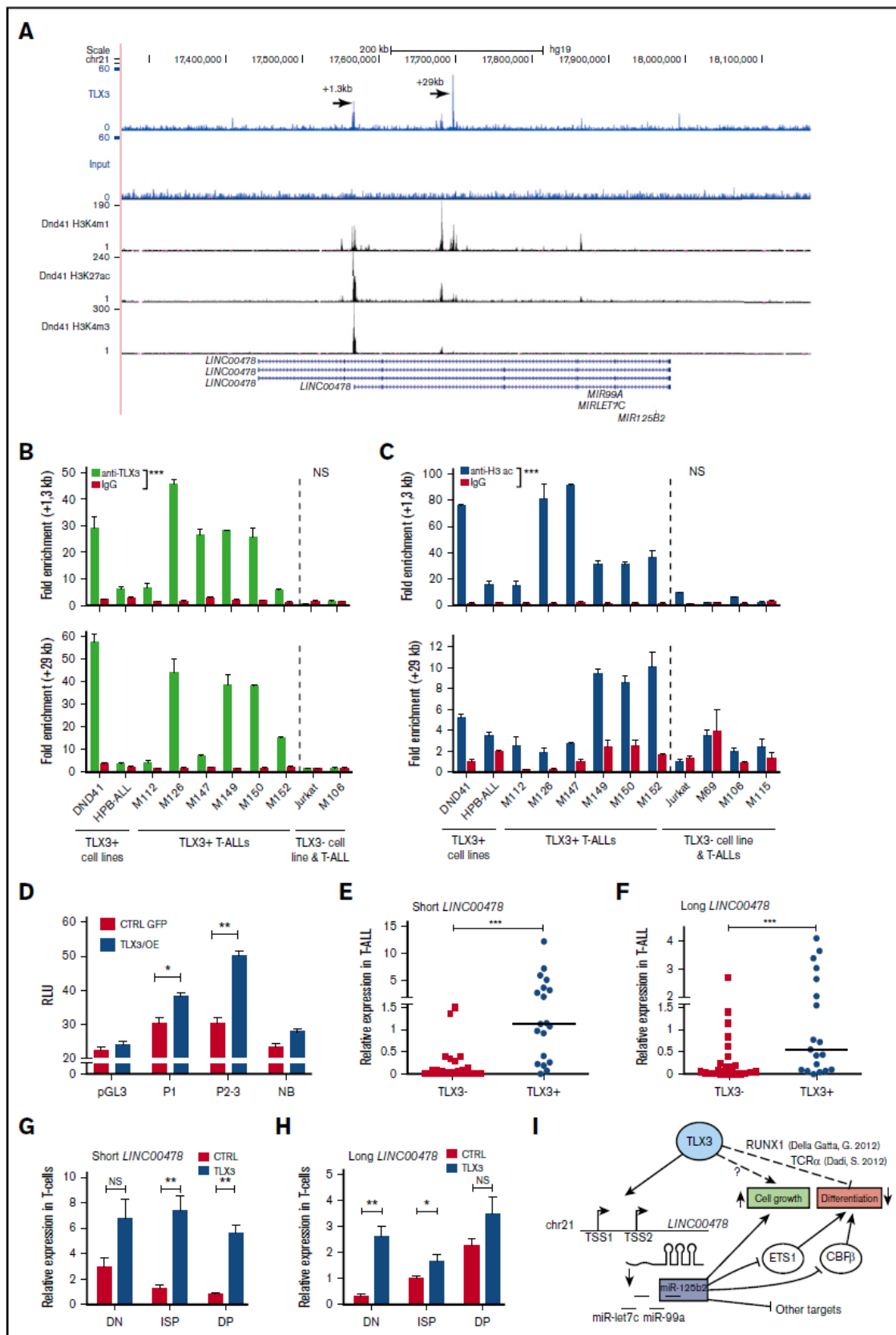


Figure 7.



PBX1 involved in the regulation of the miR-99a, let-7c, and miR-125b-2 tricistron in hematopoietic stem cells occupy binding sites located at -18 to +866 bp from TSS2 of *LINC00478*.<sup>43</sup> We show that TLX3 binds to 2 transcriptionally active genomic regions mapping to the *LINC00478* gene. However, the in-fine molecular mechanism of activation awaits further investigations as no consensus TLX3-binding sites and few regulatory partners were reported. TLX1 and TLX3 transcription factors have nearly identical homeodomains, although blast alignment shows that overall identity positions between these proteins is 54%. Genome-wide binding profiles of TLX1, in the context of T-ALL, showed the enrichment of RUNX- and ETS-binding sites in the promoters of TLX1-repressed genes.<sup>12,44</sup> Computing analysis of the +1.3-kb TLX3-binding region of *LINC00478* indicated close RUNX (WAACCAC) and ETS (AGGAARY) motifs and other 3 separate ETS motifs. However, our ChIP-seq experiments with ETS1 in the same patient did not reveal ETS1 binding at these locations, nor at the +29-kb region (data not shown). At least for this particular case, ETS1 does not seem to be directly involved in the regulation of *LINC00478*.

ChIP-seq analysis of primary T-ALL did not find any TLX3-binding sites near the *MIR125B1* locus despite very similar genomic organization of *MIR125B1* and *MIR125B2* clusters. Independent regulation of miRNAs residing in these clusters is described in myeloid malignancies and in nonhematopoietic context via regulatory binding sites close to the pre-miR-125b-1 sequence.<sup>45</sup> The differences in regulation of miRNAs from these 2 clusters may rely on accelerated evolution of regulatory elements compared with the coding sequences.

Let-7c expression did not correlate with miR-125b-2 and miR-99a. Uncoordinated expression profiles of several clustered miRNAs related to the posttranscriptional modulation of the miRNA maturation process have been reported.<sup>46,47</sup>

Our hypothesis that miR-125b is implicated in the genesis of T-ALL relies on the sustained cell growth and impaired differentiation observed upon enforced expression of TLX3 or miR-125b in T-cell progenitors. 125b/OE in mature T-ALL enhances leukemia propagation, outlining the oncogenic potential of miR-125b in T-ALL. Both TLX3/OE- and 125b/OE-transduced human T-cell progenitors have similar differentiation blocks at immature DN/ISP stages and proliferative advantage. In normal T-cell development, miR-125b expression drops in early progenitors and this process may help the maturation process. Transcription factor ETS-1 promotes early thymocyte differentiation mediated by the pre-TCR complex.<sup>48</sup> In Ets1-deficient mice, the numbers of thymocytes and lymph node

resident T cells are markedly decreased and T cells undergo apoptosis.<sup>49</sup> TLX1 and TLX3 proteins physically interact with ETS1 and thus repress TCR $\alpha$  enhancosome activity leading to the blockage of TCR-J $\alpha$  rearrangement and T-cell development.<sup>10</sup> On the other hand, bioinformatic tools (PICTAR-VERT, TARGETSCAN-VERT) predict 2 recently validated conserved miR-125b-binding sites in the 3' untranslated region of ETS1 mRNA.<sup>50</sup> Our results show inverse correlation of ETS1 and miR-125 expression in the model of T-cell differentiation perturbed by ectopic TLX3 and in TLX3 T-ALLs. ETS1 functionally interacts with the RUNX-CBF $\beta$  CBF complex where the CBF $\beta$  subunit stabilizes the binding of runt-related transcription factors RUNX1 or RUNX3 to target DNA sequences, including TCR enhancers.<sup>51</sup> Of note, CBF $\beta$  is also a validated target of miR-125b in hematopoietic cells.<sup>52</sup> Development of early T-cell progenitors is very sensitive to an incremental reduction of CBF $\beta$  levels in the mouse model carrying hypomorphic alleles of the gene<sup>53</sup> with differentiation blockage occurring in CD4/CD8<sup>-</sup> DN1, DN2, and DN3 stage and affecting TCR $\beta$  expression.<sup>53</sup> These observations may explain the drastic effect of ectopic miR-125b in our in vitro differentiation model as human T-cell progenitors show the differentiation block at the DN stage and the levels of lentiviral miR-125b expressions are higher (up to 30-fold) than those induced by TLX3.

In conclusion, our results demonstrate that TLX3 and TLX3-induced *LINC00478*/miR125b cooperate in oncogenic transformation of human T cells. miR-125b contributes to maturation arrest in T-ALL via downregulation of *ETS1* and *CBF $\beta$*  genes (Figure 7) that might be a part of a mechanism leading to disease progression. Our study uncovers a novel regulatory pathway, which offers new opportunities for the development of original therapeutic approaches.

## Acknowledgments

The authors acknowledge all patients who allowed them to use their cells for research, B. Canque for sharing thymic specimens, and the medical staff who collected samples at the following French hospitals: A. Trousseau and R. Debré in Paris, Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique in Lyon, Noriets in Vitry-sur-Seine, and Antoine-Béclère in Clamart. Cell sorting was performed at the cytometry platform of the Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire with N. Dechamps. P. Fouchet helped isolating T-cell subsets. The authors are grateful to M.-L. Arcangeli for expertise and kind help in cytometry analysis, and P. H. Romeo and A. Gortchakov for very helpful critical reading of the manuscript.

This work was supported by Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, INSERM, Université Paris

**Figure 7. TLX3 directly regulates miR-125b-2 expression in T-ALL cells.** (A) TLX3 ChIP-seq analysis performed for 1 newly diagnosed primary T-ALL. Gene tracks represent binding at the *MIR-125B-2* locus on chromosome 21. Y-axis values show the number of sequence reads. Positions of 2 major binding peaks are indicated relative to the TSS of the shorter transcript of *LINC00478*, which overlaps with the *MIR-99a/LET7C/MIR125B-2* locus. Two TLX3-binding regions are also enriched in H3K4me1 and H3K4me3, marking promoter/transcriptional initiation sites and H3K27ac marking active regulatory elements in the DND41 cell line (ENCODE). (B) TLX3 ChIP-Q-PCR analysis of DND41 and HPB-ALL TLX3-expressing cell lines and of 6 primary TLX3 T-ALLs. Shown are fold enrichment values at +1.3-kb and +29-kb binding regions of *LINC00478* locus relative to the *IGX1A* ORF-free intergenic region containing no TSS. All ChIP experiments were performed at least twice. (C) Histone H3 acetylation at the +1.3-kb and +29-kb chromatin regions in TLX3<sup>+</sup> and TLX3<sup>-</sup> cell lines and T-ALLs assessed by ChIP-Q-PCR analysis. Fold enrichment values relative to the *IGX1* locus is shown. (D) Luciferase reporter assay in 293T cells. The empty pGL3 promoter plasmid and nonbinding 980-bp fragment immediately downstream of TLX3 binding "+1.3-kb" region served as negative controls. Relative luminescence units (RLU) were determined by normalizing firefly to Renilla luciferase activity (n = 4). (E-H) Relative expression of 2 *LINC00478* transcripts normalized to *ABL1* ( $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100$ ): (E-F) in TLX3<sup>-</sup> (N = 26) and TLX3<sup>+</sup> (N = 19) T-ALLs and (G-H) in TLX3/OE and CTRL HPC-derived T cells at day 42 of differentiation. (B-H) Data are presented as mean  $\pm$  SEM of values: \*\*\*P < .001; \*\*P < .01; \*P < .05; Mann-Whitney U test. (I) A simplified view of TLX3-miR-125b relations in T-ALL and involvement of miR-125b target genes in the blockage of T-cell development.

Diderot, and Université Paris Sud, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC; 07/1/4959), Association Laurette Fugain (08/02), and Ligue contre le Cancer (LNCC; Équipe Labellisée).

L.R. was a fellow of the French Ministry of Education and ARC.

## Authorship

Contribution: L.R., C.D., J.C., B.U., A. Benyoucef, I.N., F.P., and A.C. performed experiments; I.N., F.P., L.R., and P.B. designed the experiments, analyzed the results, and wrote the manuscript; P.Y.-B. provided statistical analysis; S.S., M.B., and V.A. provided ChIP-seq and RNA-seq bioinformatic analyses; P.Y.-B., S.S., and V.A. critically read

the manuscript; and A. Baruchel, J.L.-P., and P.B. provided patient samples and shared crucial information.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Irina Naguibneva, Laboratoire des Cellules Souches Hématopoïétiques et Leucémiques, Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, IRCM, CEA, 18 route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France; e-mail: irina.naguibneva@cea.fr; or Paola Ballerini, Service d'Hématologie Pédiatrique, Hôpital A. Trousseau, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; e-mail: paola.ballerini@trs.aphp.fr.

## References

1. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):380-390.
2. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3398-3406.
3. Asnafi V, Beldjord K, Libura M, et al. Age-related phenotypic and oncogenic differences in T-cell acute lymphoblastic leukemias may reflect thymic atrophy. *Blood*. 2004;104(13):4173-4180.
4. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2002;1(1):75-87.
5. Soulier J, Clappier E, Cayuela JM, et al. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood*. 2005;106(1):274-286.
6. Shirasawa S, Arata A, Onimaru H, et al. Rnx deficiency results in congenital central hypoventilation. *Nat Genet*. 2000;24(3):287-290.
7. Berger R, Dastugue N, Busson M, et al; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). t(5;14)/HOX11L2-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia. A collaborative study of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). *Leukemia*. 2003;17(9):1851-1857.
8. Bernard OA, Busson-LeConiat M, Ballerini P, et al. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2001;15(10):1495-1504.
9. Su X, Della-Valle V, Delabesse E, et al. Transcriptional activation of the cardiac homeobox gene CSX1/NKX2-5 in a B-cell chronic lymphoproliferative disorder. *Haematologica*. 2008;93(7):1081-1085.
10. Dadi S, Le Noir S, Payet-Bornet D, et al. TLX homeodomain oncogenes mediate T cell maturation arrest in T-ALL via interaction with ETS1 and suppression of TCR $\alpha$  gene expression. *Cancer Cell*. 2012;21(4):563-576.
11. Van Vlierberghe P, van Grotel M, Tchinda J, et al. The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2008;111(9):4668-4680.
12. Della Gatta G, Palomero T, Perez-Garcia A, et al. Reverse engineering of TLX oncogenic transcriptional networks identifies RUNX1 as tumor suppressor in T-ALL. *Nat Med*. 2012;18(3):436-440.
13. Neilson JR, Zheng GX, Burge CB, Sharp PA. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev*. 2007;21(5):578-589.
14. Rossi RL, Rossetti G, Wenandy L, et al. Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naïve state in CD4+ T cells by the microRNA miR-125b. *Nat Immunol*. 2011;12(8):796-803.
15. Ebert MS, Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*. 2012;149(3):515-524.
16. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(24):15524-15529.
17. Bousquet M, Quelen C, Rosati R, et al. Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *J Exp Med*. 2008;205(11):2499-2506.
18. Sonoki T, Iwanaga E, Mitsuya H, Asou N. Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2005;19(11):2009-2010.
19. Thorsen J, Aamot HV, Roberto R, Tjønnfjord GE, Micci F, Heim S. Myelodysplastic syndrome with a t(2;11)(p21;q23-24) and translocation breakpoint close to miR-125b-1. *Cancer Genet*. 2012;205(10):528-532.
20. Mavrakis KJ, Van Der Meulen J, Wolfe AL, et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) [published correction appears in *Nat Genet*. 2011;43(8):815]. *Nat Genet*. 2011;43(7):673-678.
21. Sanghvi VR, Mavrakis KJ, Van der Meulen J, et al. Characterization of a set of tumor suppressor microRNAs in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Signal*. 2014;7(352):ra111.
22. Armstrong F, Brunet de la Grange P, Gerby B, et al. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood*. 2009;113(8):1730-1740.



23. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179.
24. Calvo J, BenYousef A, Baijor J, Rouyez MC, Pflumio F. Assessment of human multi-potent hematopoietic stem/progenitor cell potential using a single in vitro screening system. *PLoS One.* 2012;7(11):e50495.
25. Amsellem S, Ravet E, Fichelson S, Pflumio F, Dubart-Kupperschmitt A. Maximal lentivirus-mediated gene transfer and sustained transgene expression in human hematopoietic primitive cells and their progeny. *Mol Ther.* 2002;6(5):673-677.
26. Gerby B, Armstrong F, de la Grange PB, et al. Optimized gene transfer into human primary leukemic T cell with NOD-SCID/leukemia-initiating cell activity. *Leukemia.* 2010;24(3):646-649.
27. Ravet E, Reynaud D, Titeux M, et al. Characterization of DNA-binding-dependent and -independent functions of SCL/TAL1 during human erythropoiesis. *Blood.* 2004;103(9):3326-3335.
28. Carrasco YR, Navarro MN, de Yébenes VG, Ramiro AR, Toribio ML. Regulation of surface expression of the human pre-T cell receptor complex. *Semin Immunol.* 2002;14(5):325-334.
29. Enomoto Y, Kitaura J, Hatakeyama K, et al. Eμ/miR-125b transgenic mice develop lethal B-cell malignancies. *Leukemia.* 2011;25(12):1849-1856.
30. Bousquet M, Harris MH, Zhou B, Lodish HF. MicroRNA miR-125b causes leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(50):21558-21563.
31. Emmrich S, Katsman-Kuipers JE, Henke K, et al. miR-9 is a tumor suppressor in pediatric AML with t(8;21). *Leukemia.* 2014;28(5):1022-1032.
32. Lin KY, Zhang XJ, Feng DD, et al. miR-125b, a target of CDX2, regulates cell differentiation through repression of the core binding factor in hematopoietic malignancies. *J Biol Chem.* 2011;286(44):38253-38263.
33. Atak ZK, Gianfelici V, Hulselmans G, et al. Comprehensive analysis of transcriptome variation uncovers known and novel driver events in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003997.
34. Trimarchi T, Bilal E, Ntziachristos P, et al. Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia. *Cell.* 2014;158(3):593-606.
35. Mavrakis KJ, Leslie CS, Wendel HG. Cooperative control of tumor suppressor genes by a network of oncogenic microRNAs. *Cell Cycle.* 2011;10(17):2845-2849.
36. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Gibson WS, Balazs AB, Baltimore D. MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(32):14235-14240.
37. Chapiro E, Russell LJ, Struski S, et al. A new recurrent translocation t(11;14)(q24;q32) involving IGH@ and miR-125b-1 in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2010;24(7):1362-1364.
38. Klusmann JH, Li Z, Böhmer K, et al. miR-125b-2 is a potential oncomiR on human chromosome 21 in megakaryoblastic leukemia. *Genes Dev.* 2010;24(5):478-490.
39. Gefen N, Binder V, Zaliava M, et al. Hsa-mir-125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53. *Leukemia.* 2010;24(1):89-96.
40. Schotte D, De Menezes RX, Akbari Moqadam F, et al. MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2011;96(5):703-711.
41. Van Vlierberghe P, Homminga I, Zuurbier L, et al. Cooperative genetic defects in TLX3 rearranged pediatric T-ALL. *Leukemia.* 2008;22(4):762-770.
42. Marson A, Levine SS, Cole MF, et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell.* 2008;134(3):521-533.
43. Emmrich S, Rasche M, Schöning J, et al. miR-99a/100~125b tricistrons regulate hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis by shifting the balance between TGFβ and Wnt signaling. *Genes Dev.* 2014;28(8):858-874.
44. Durinck K, Van Loocke W, Van der Meulen J, et al. Characterization of the genome-wide TLX1 binding profile in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2015;29(12):2317-2327.
45. Zhou R, Hu G, Gong AY, Chen XM. Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(10):3222-3232.
46. Ryazansky SS, Gvozdev VA, Berezkov E. Evidence for post-transcriptional regulation of clustered microRNAs in Drosophila. *BMC Genomics.* 2011;12:371.
47. Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell.* 2008;32(2):276-284.
48. Eyquem S, Chemin K, Fasseu M, Bories JC. The Ets-1 transcription factor is required for complete pre-T cell receptor function and allelic exclusion at the T cell receptor beta locus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(44):15712-15717.
49. Bories JC, Willerford DM, Grévin D, et al. Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature.* 1995;377(6550):635-638.
50. Zhang Y, Yan LX, Wu QN, et al. miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer. *Cancer Res.* 2011;71(10):3552-3562.
51. Tahirov TH, Inoue-Bungo T, Morii H, et al. Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFbeta. *Cell.* 2001;104(5):755-767.
52. Bousquet M, Nguyen D, Chen C, Shields L, Lodish HF. MicroRNA-125b transforms myeloid cell lines by repressing multiple mRNA. *Haematologica.* 2012;97(11):1713-1721.
53. Talebian L, Li Z, Guo Y, et al. T-lymphoid, megakaryocyte, and granulocyte development are sensitive to decreases in CBFbeta dosage. *Blood.* 2007;109(1):11-21.

## Speed of leukemia development and genetic diversity in xenograft models of T cell acute lymphoblastic leukemia

Sandrine Poglio<sup>1,2,3,4</sup>, Daniel Lewandowski<sup>2,3,4,5</sup>, Julien Calvo<sup>1,2,3,4</sup>, Aurélie Caye<sup>6,7</sup>, Audrey Gros<sup>8,9</sup>, Elodie Laharanne<sup>8,9</sup>, Thierry Leblanc<sup>10</sup>, Judith Landman-Parker<sup>11</sup>, André Baruchel<sup>10</sup>, Jean Soulier<sup>6,12,13</sup>, Paola Ballerini<sup>1,2,3,4,11</sup>, Emmanuelle Clappier<sup>6,12,13</sup>, Françoise Pflumio<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), DSV-IRCM-SCSR-LSHL, UMR 967, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup>INSERM, U967, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>3</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>4</sup>Université Paris-Sud, UMR 967, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>5</sup>CEA, DSV-IRCM-SCSR-LRTS, UMR 967, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>6</sup>Université Paris Diderot, Paris, France

<sup>7</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Département de Génétique, UF de Génétique Moléculaire, Hôpital Robert Debré Paris, France

<sup>8</sup>INSERM, UMR1053 Bordeaux Research in Translational Oncology (BaRITOn), Bordeaux, France

<sup>9</sup>Université de Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>10</sup>AP-HP, Service d'hématologie Pédiatrique, Hôpital Robert Debré, Paris, France

<sup>11</sup>AP-HP, Service d'hématologie Pédiatrique, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France

<sup>12</sup>AP-HP, Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

<sup>13</sup>Team Genome and Cancer, U944 INSERM, Paris, France

**Correspondence to:** Françoise Pflumio, **email:** francoise.pflumio@cea.fr  
Sandrine Poglio, **email:** sandrine.poglio@u-bordeaux.fr

**Keywords:** T-ALL, leukemia initiating cells, clonal selection, CD34, xenograft

**Received:** June 29, 2015

**Accepted:** April 22, 2016

**Published:** May 12, 2016

### ABSTRACT

**T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) develops through accumulation of multiple genomic alterations within T-cell progenitors resulting in clonal heterogeneity among leukemic cells. Human T-ALL xeno-transplantation in immunodeficient mice is a gold standard approach to study leukemia biology and we recently uncovered that the leukemia development is more or less rapid depending on T-ALL sample. The resulting human leukemia may arise through genetic selection and we previously showed that human T-ALL development in immune-deficient mice is significantly enhanced upon CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> leukemic cell transplantations. Here we investigated the genetic characteristics of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells from newly diagnosed human T-ALL and correlated it to the speed of leukemia development. We observed that CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> T-ALL cells that promote leukemia within a short-time period are genetically similar, as well as xenograft-derived leukemia resulting from both cell fractions. In the case of delayed T-ALL growth CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells were either genetically diverse, the resulting xenograft leukemia arising from different but branched subclones present in the original sample, or similar, indicating decreased fitness to mouse micro-environment. Altogether, our work provides new information relating the speed of leukemia development in xenografts to the genetic diversity of T-ALL cell compartments.**



## INTRODUCTION

Hematopoiesis is the normal process for whole mature blood cell production. This process takes place in the bone marrow (BM) and its deregulation is the basis of multiple malignancies, including leukemia. Development of leukemia occurs through progressive cell transformations in early immature hematopoietic stem or progenitor cells, such as in chronic (CML) and acute myeloid leukemia (AML) (reviewed in [1]). Careful analyses of leukemic subpopulations led to postulate of the presence of leukemia initiating/stem cells that represent an ideal target for anti-cancer therapies [2].

T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) result from an aberrant accumulation of immature T cells bearing multiple oncogenic lesions in blood and BM [3]. Access to patient samples helped developing relevant experimental models to study this hematologic disorder [4]. Using xenograft models, several groups tested whether, as for AML [5, 6] T-ALL include subpopulations of cells that are more fitted to serial re-initiation of leukemic development following transplantation into immunodeficient mice [4, 7, 8]. Such cells were thereafter found enriched amongst cells expressing or not CD34, CD1a, CD4 and/or CD7 surface markers [7-9]. In this context our group showed that CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells sorted from several T-ALL samples promote T-ALL development more frequently and faster than their CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> counterparts [9]. However, depending on the considered leukemia sample and contrary to CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells found in normal thymocyte differentiation, we observed that T-ALL-derived CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells are not uniformly early T cell progenitors as they may co-express CD34 with mature surface markers such as CD4, CD8 and/or CD3/TCR $\alpha\beta$  [9]. The reason why CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> leukemic cells are more aggressive is thus not uniformly related to their immaturity and remains obscure in many cases. CD34 is a glycoprotein promoting normal T-cell adhesion through L-selectin interaction with endothelial cells [10], which suggests that functional differences between CD34<sup>+/+</sup> cell fractions may be explained by distinct adhesion and migration inside the bone marrow (BM). Beside we have shown that leukemia development following transplantation of T-ALL patient cells into immunodeficient mice coincides with selection of genetic subclones that bear an enhanced ability to re-initiate T-ALL [11] and leukemia development is more or less rapid correlating with several biological and molecular characteristics of leukemia samples [12].

On the follow up of those studies we genetically characterized CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> T-ALL cells to understand the biological basis of their distinct functional properties. We also correlated these characteristics with the speed of leukemia development in xenografts. We observed that CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+/+</sup> cell fractions from the T-ALL we studied endowed with fast promoting leukemia activity are homogenous in terms of

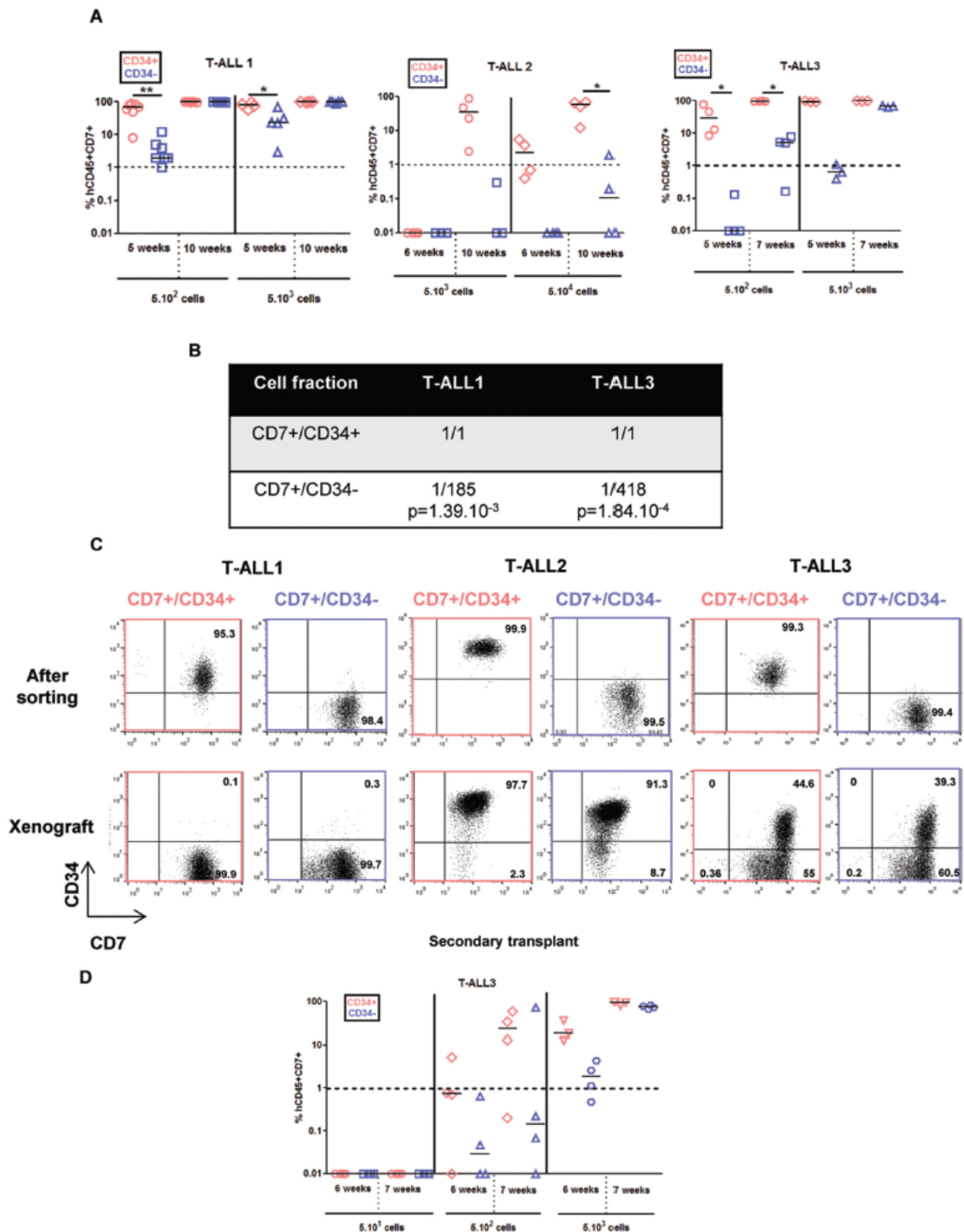
genetics and migration/niche adhesion abilities. Besides CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+/+</sup> cell fractions from studied T-ALL samples with delayed leukemia development activity are either genetically heterogeneous or homogenous. In such slow developing T-ALL differential CD34 expression may thus distinguish genetically diverse cell fractions with distinct abilities to re-establish leukemia in mice or genetically homogenous cell fractions with a weak growing fitness in mouse. These results uncover the broad diversity between leukemia samples and between leukemic sub-fractions in their functional ability to develop in xenograft models. They provide new information to understand T-ALL development in xenografts, relating phenotypic cell sub fractionating, genetic diversity and speed of leukemia development.

## RESULTS

### CD34<sup>+/+</sup> cells from fast growing samples show identical genomic alterations and phenotypes

Different numbers ( $5 \times 10^2$  to  $5 \times 10^5$  cells/mouse) of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells sorted from the blood of newly diagnosed human T-ALL (T-ALL1-6, Supplementary Table S1) were transplanted into NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$  (NSG) mice based on previous results obtained with these samples [9, 12]. BM cells were sampled regularly from 5 to 20 weeks and leukemia development was measured *via* the percentage of hCD7<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells [4]. Leukemia development ability was quantified using the proportion of NSG mice with over 1% hCD7<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells at a given time point (5 weeks for T-ALL1, 7 weeks for T-ALL3 and 20 weeks for T-ALL5). The time to leukemia (TTL) development was variable in the different T-ALL cases and T-ALL1-3 leukemia developed as early as 5-6 weeks after injection upon  $5-50 \times 10^2$  cells (Figure 1A) all three being thus considered as short TTL [12]. In accordance with [9], CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells were more prone to generate leukemia than CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells in the studied T-ALL cases, albeit this difference could be reduced as in T-ALL1 (Figure 1A-1B). For T-ALL3 case, cells isolated from primary mice re-initiated leukemia with a slight delay for CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells compared to CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells in secondary recipient (Figure 1D).

As leukemia development relies on clonal selection in xenograft [11], we hypothesized that the difference in aggressiveness between CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells relates on the presence in both sub-fractions of distinct genetic subclones. Genomic alterations being very frequent oncogenic alterations in T-ALL [3], array-CGH analyses were performed in order to investigate whether molecular lesions would segregate with the distinct cell populations at diagnosis and at what extent they would be detected after xenograft. For T-ALL1-3 cases, sorted CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+/+</sup> populations at diagnosis, as well as cells recovered from engrafted mice, showed identical genetic alterations with



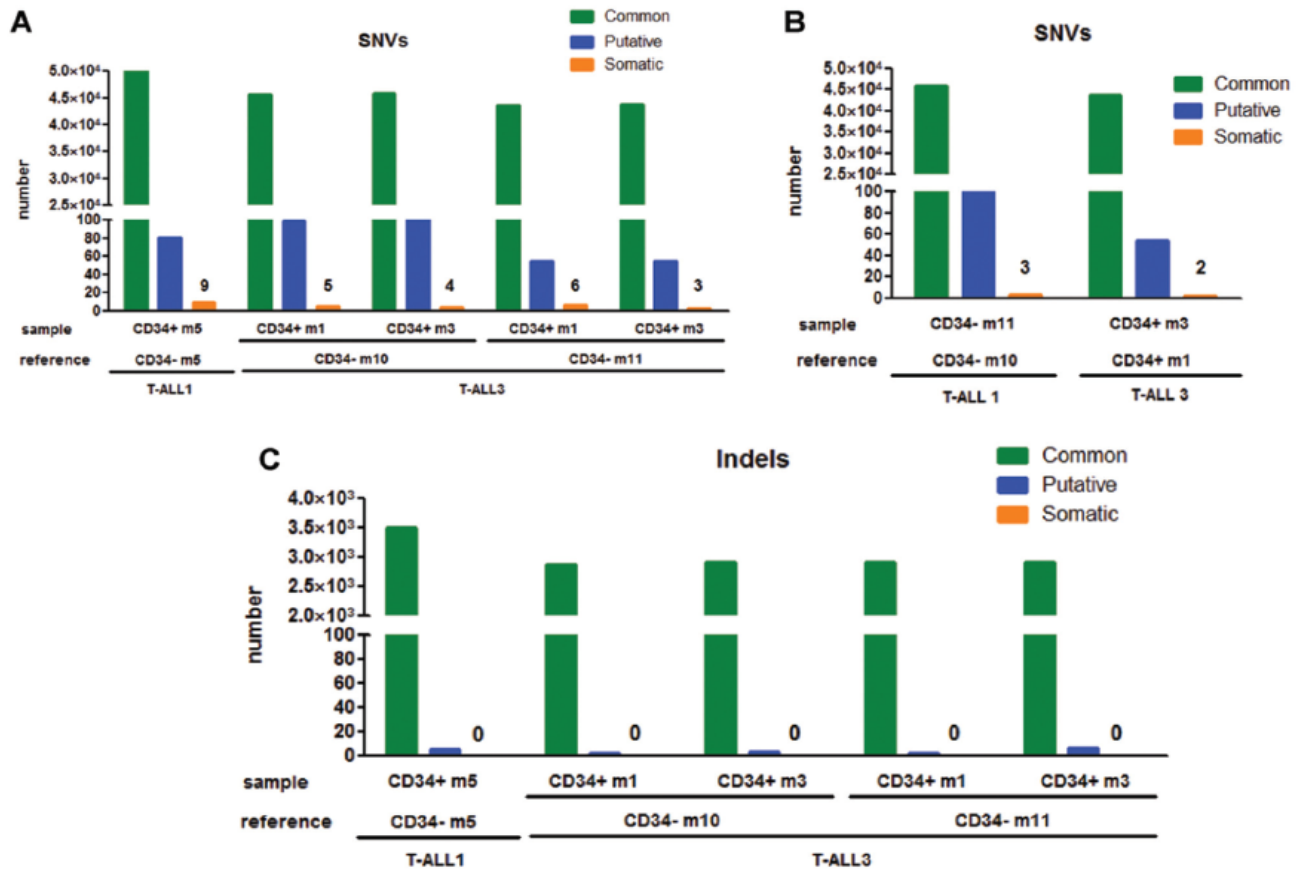
**Figure 1: CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cell fractions from 3 fast growing T-ALL samples have different kinetics of leukemia development but leukemic cells derived from xenograft harbouring same phenotype.**  $5 \times 10^2$  (T-ALL1, T-ALL3),  $5 \times 10^3$  (T-ALL1, T-ALL2, T-ALL3),  $5 \times 10^4$  (T-ALL2) of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (red points) and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> (blue points) T-ALL cells/mouse were injected by iv route into NSG mice. **A.** Engraftment kinetics for individual mice. The percent of hCD45<sup>+</sup>hCD7<sup>+</sup> leukemic cells detected by FACS in BM samplings or at euthanasia (end points) are shown. Statistics were determined using the 2-tailed Mann and Whitney test. \* $p < 0.05$ . **B.** Frequency of cells endowed with leukemia initiation ability in different patient samples was determined using Extreme Limiting Dilution analysis software (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) using 3 cell doses of T-ALL1 and T-ALL3 ( $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$  and  $5 \times 10^3$  cells /mouse). **C.** CD34 and CD7 expression in leukemic cells following cell sorting from newly diagnosed samples (upper panel) and from human hCD45<sup>+</sup>hCD7<sup>+</sup> cells recovered from BM of xenografted NSG mice (lower panel). CD34 positivity was set according to isotype controls. **D.** Leukemia development following secondary transplants of total BM cells isolated from primary mice transplanted with CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (red) or CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> (blue) sorted T-ALL cells. Results are from T-ALL3.

no evidence of major clonal selection during leukemia development in xenograft (Supplementary Tables S2, S3 and S4). These results were confirmed using whole-exome sequencing (WES) of DNA from xenografted CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells and matched CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells in T-ALL1 and T-ALL3. This analysis yielded a mean depth of 115-141x and 88-90% of targeted bases were covered to a depth of 25× or more. Comparison of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>-derived and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> derived xenografted cells identified very few (3 to 9) somatic Single Nucleotide Variants (SNVs) and no small insertion or deletion (indel) (Figure 2A, 2C). Similar results were obtained by comparing the data of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells intrinsically but from different mice (Figure 2B), indicating differences between CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> derived xenografted cells could be related to mouse rather than to injected cell fraction differences. Importantly no alteration linked to CD34 expression and no high functional consequences of somatic variants was predicted by Variant Effect Predictor software. Leukemic cells recovered from mice transplanted with CD7<sup>+</sup>/

CD34<sup>+</sup> or CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells from T-ALL1-3 were also phenotypically identical in terms of CD34/CD7 and CD4/CD8 marker expression further supporting the similarity of the xenografts issued from both cell fractions (Figure 1C and Supplementary Figure S1B). Interestingly differences existed between xenografted cells and the original sample (Figure 1C and Supplementary Figure S1), suggesting a change in surface marker expression levels maybe in relation with the mouse microenvironment. Altogether these results indicated that the genetic clonal architecture is rather simple in cases of fast growing T-ALL with no major genetic differences between CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> cells.

### CD34 expression does not promote enhanced cell homing in fast growing leukemic cells

As CD34 regulates cell migration and adhesion [10], we studied whether the distinct leukemia development activity between CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> cells from T-ALL1 and T-ALL2 was based on a differential homing capacity.



**Figure 2: Comparative analyses of genomic alterations identified in CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> vs CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> derived xenograft leukemia.** A–B. For T-ALL1 and 3, we performed whole-exome sequencing on xenografted CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and matched xenografted CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells DNA (A) or by comparing the data of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells together (B). Number of Single Nucleotide Variants (SNVs) was defined as mentioned in Supplementary Material and Methods. Number of alterations were detailed for shared variations (Common), hazardous alterations (Putative) and differences in tested sample vs reference (Somatic). C. Number of small insertion or deletion (Indels) was shown for xenografted CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and matched xenografted CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells DNA as described above.

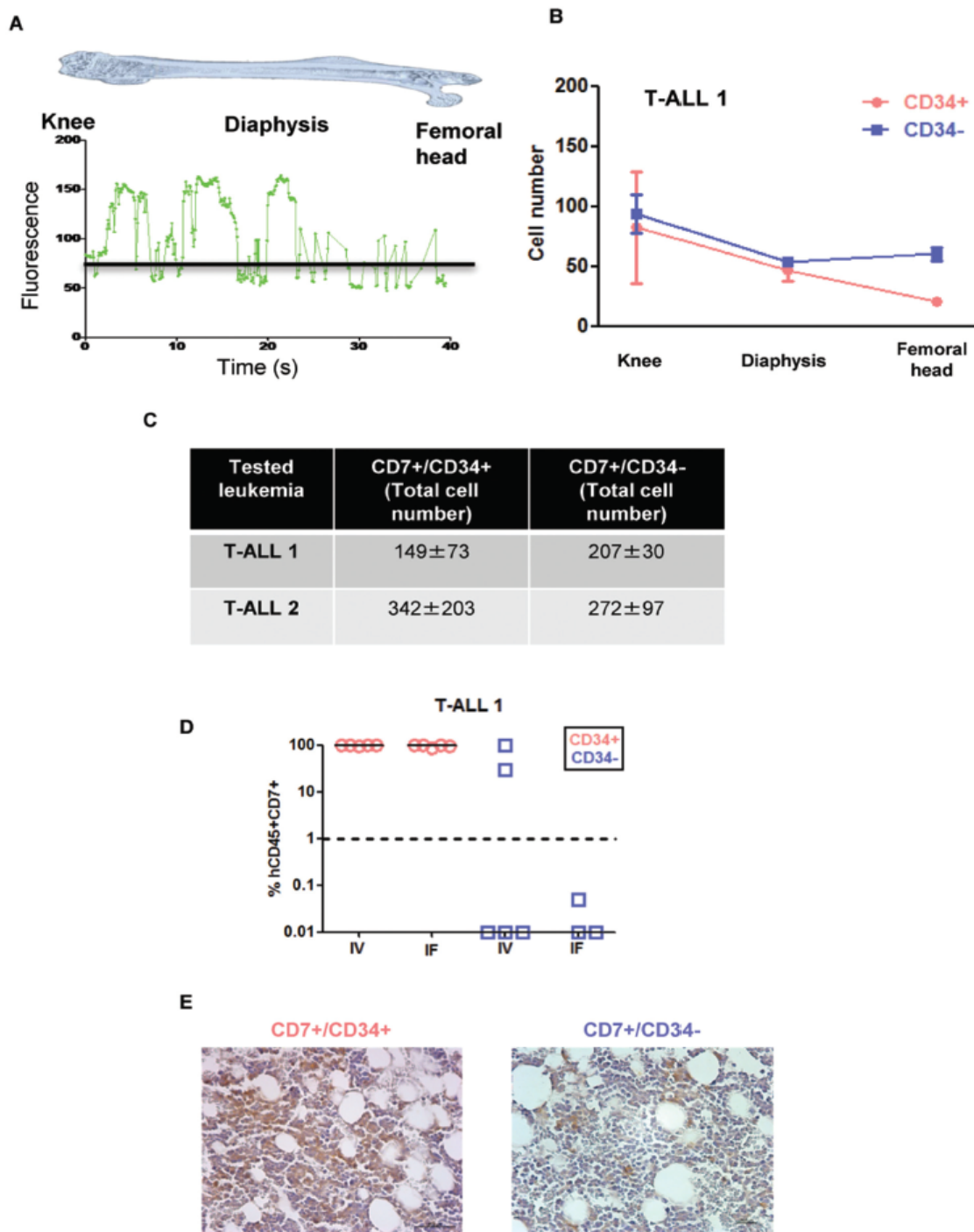


Sorted CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells were stained with Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) before transplantation and tracked using a Cell Vizio-instrument (Mauna Kea Technologies) to monitor their migration and adhesion to the niches into BM as developed in [13] (Figure 3A and Supplementary Figure S2). Leukemic CFSE<sup>+</sup> cells were detectable only 72h after injection, with no difference with respect to the engraftment cell number or invaded BM areas between CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells (Figure 3A–3C and Supplementary Figure S2B). Moreover injecting CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells from T-ALL1 and T-ALL2 using *iv* or intra-femur route did not change the difference of engraftment observed with both fractions (Figure 3D and Supplementary Figure S2C). Kinetic analysis of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+/−</sup> leukemic cell growth *in vivo* using immunohistochemistry did not allow early cell infiltration analysis but revealed higher late infiltration level for CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>-derived xenografts compared to CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>-derived leukemia (Figure 3E) in accordance with flow cytometry datas (Figure 1A). Thus differences in leukemia development abilities between CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells in fast growing T-ALL do not rely on distinct early homing properties.

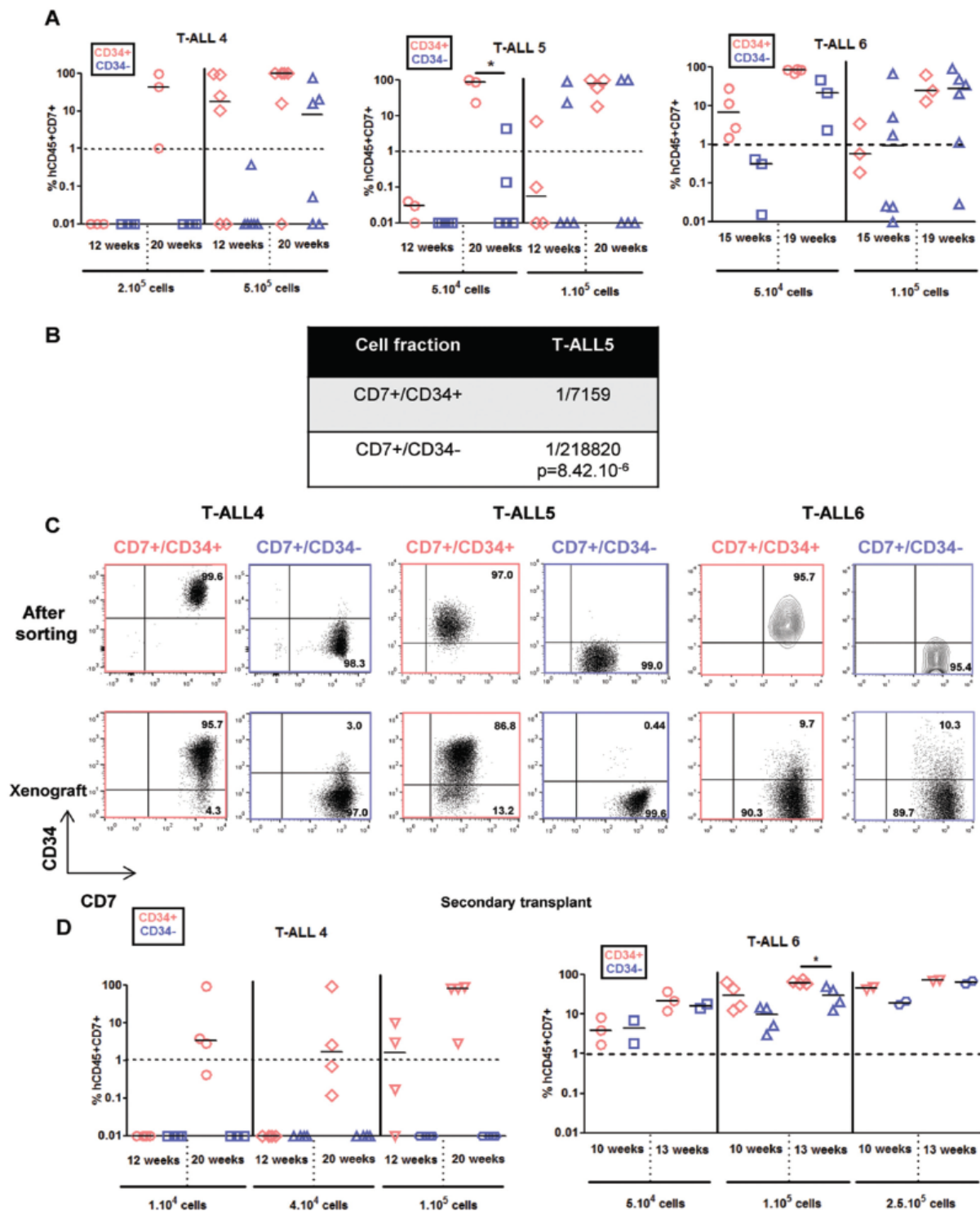
#### **T-ALL with delayed leukemia development ability are either genetically heterogeneous or homogenous and CD34 expression may discriminate specific subclones**

We also studied 3 T-ALL that have a delayed leukemia development capacity [12]. T-ALL4-6 required 12 to 20 weeks to develop in mice even though >10 times more cells were transplanted from either CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cell sub-fraction (Figure 4A). As for T-ALL1-3, CD34<sup>+</sup> cells produced leukemia in xenograft faster meaning they were more aggressive than CD34<sup>-</sup> cells although increasing the injected cell number allowed to observe and quantify leukemia development also in CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells of all 3 slow-growing T-ALL (Figure 4A–4B). Interestingly except for T-ALL6, the expression of CD4 and CD8 cell surface markers were distinct between xenografts derived from CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells (Supplementary Figure S1B) although, within the same sample, CD34 and CD7 expression remained similar to the diagnosis sub-populations from which they derived (Figure 4C). The differences observed at diagnosis in terms of CD4 and CD8 expression between CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> cells were accentuated after xenografts except again for T-ALL6 (Supplementary Figure S1). Array-CGH analyses revealed that leukemic cells recovered from mice transplanted with CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells from T-ALL4 and T-ALL5 shared several molecular lesions with the cells at diagnosis from which they derived, indicating clonal relationship (Figure 5A–5B and Supplementary Figure S3). However cells from T-ALL4 and T-ALL5 xenografts carried additional distinct genetic lesions (Figure 5A–5B

and Supplementary Figure S3), indicating clonal evolution during leukemia development in mice. In the case of T-ALL4, CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> derived-xenografts displayed a novel short genomic deletion of IKZF1 on the chromosome 7p12.3 not detected by array-CGH in cells at diagnosis (IKZF1del, Figure 5A–5B). IKZF1 is a tumour suppressor gene whose loss of function drives NOTCH activation and promotes T-ALL in mice [14] and which is altered recurrently in B-ALL [15], and sometimes in T-ALL [16]. IKZF1del was neither detectable by CGH-array in sorted CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells and was not selected upon transplant of these cells in NSG mice. Indeed it was absent from CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>-derived xenografts that carried a chromosome 14q21 deletion in half of cells (Figure 5B). These results indicated that T-ALL4 CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>-derived xenografts originated from distinct but related genetic subclones that were distinctly represented in CD34<sup>+/−</sup> cell fractions. By using quantitative breakpoint-specific PCR to perform clonal tracking of IKZF1del [17] in fractions sorted at diagnosis and in their derived xenografts, we detected IKZF1del in 30% of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells at diagnosis, as compared to 0.2% of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells. In CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>-derived leukemia, the proportion of IKZF1del positive cells raised to 100% in virtually all (5<sup>+</sup>/6 mice, 2 experiments) mice, indicating the reproducible selection of the IKZF1del clone, while it was barely detectable in CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>-derived xenografts (0.01% in 2/4 mice, 2 experiments, Figure 5C). Interestingly only xenografts from CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> sorted T-ALL4 leukemic cells were able to initiate leukemia in secondary transplants (Figure 4D) in accordance with our previous results [9] and secondary T-ALL were 100% IKZF1del positive cells (Figure 5C). As expected from [11], these primary xenografted cells were more aggressive than diagnostic cells as secondary transplant of 10<sup>5</sup> cells from CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> xenografts generated leukemia as early as 12 weeks post-transplant compared to no leukemia development at the same time point when two times more sorted CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> diagnostic cells had been transplanted (Figure 4A). These results suggested that enrichment of IKZF1del subclone participates into the strong CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> leukemia initiation ability in NSG mice. In the case of T-ALL5, two major genetically related sub-clonal populations were detected in the diagnosis sample, sharing identical CDKN2A/B and TCRA/D rearrangements but harbouring distinct chromosome 6q deletions (51Mb and 45Mb), each in approximately half of leukemic cells (Supplementary Figure S3A). T-ALL5 xenografts originating from CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> sorted cells harboured mainly one of these 6q deletions, either 6q/45Mb or 6q/51Mb, respectively (Supplementary Figure S3B–S3C), a minor 6q/43.2Mb deletion being also detected in mouse 3 injected with CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells, suggesting that CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells at diagnosis had probably distinct 6q deletions, a result we could not verify due to patient material limitation. Furthermore, in 2/3 mice, xenografts derived from T-ALL5 CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells

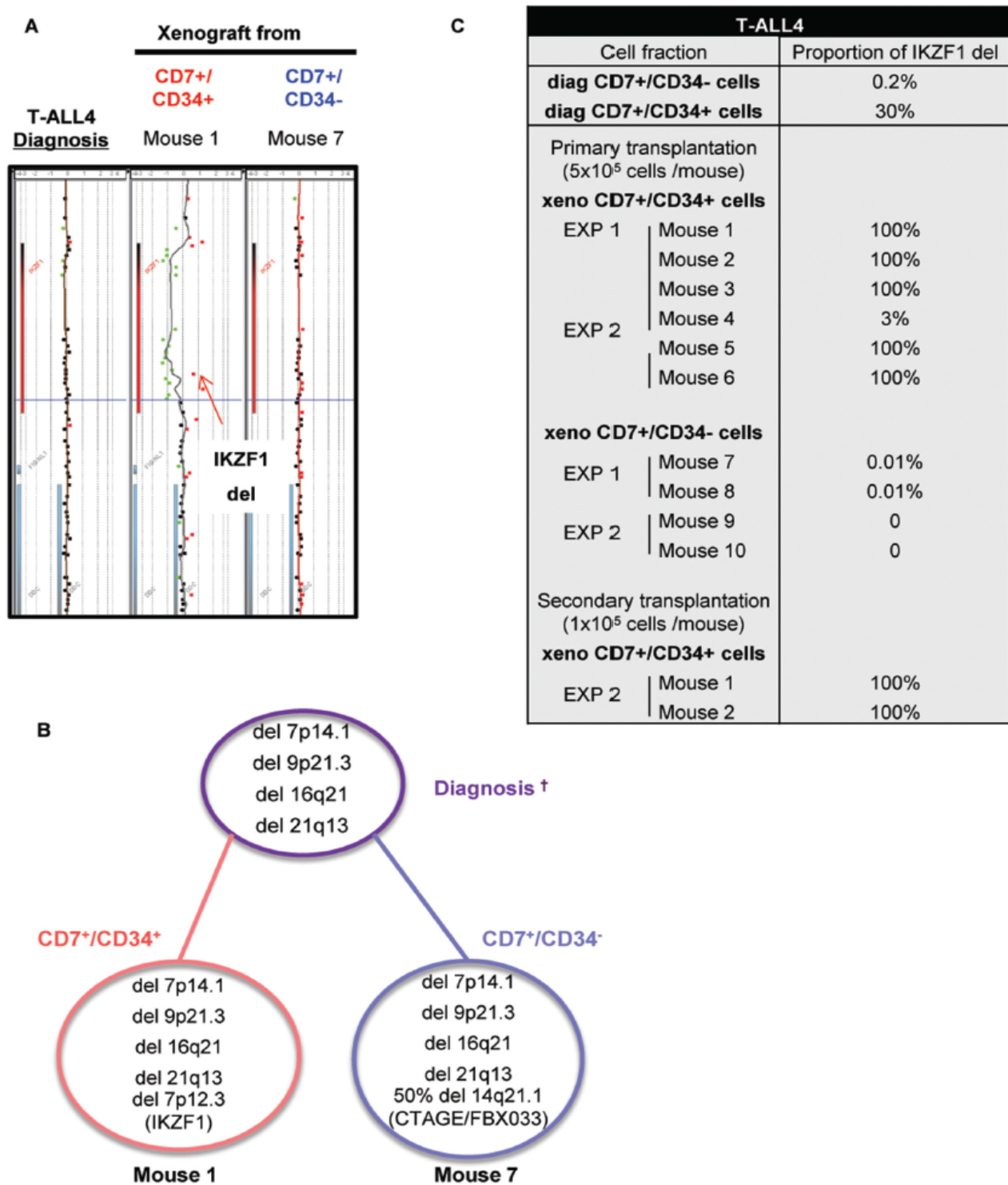


**Figure 3: Leukemia development obtained from CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cell subfractions do not rely on distinct early homing properties.** A. CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells ( $5 \times 10^4$ /mouse) from T-ALL1 and T-ALL2 were labelled with CFSE and injected intravenously into NSG mice. Shown is the mean of the relative fluorescence units detected throughout the femur by the optical fibers per individual video frame. The black line represents the background level B. Quantification of the images obtained 72 hours after transplantation. Results represent manually counted cell numbers (mean  $\pm$  SD) found on 200 video frames for each femur section (the knee, the diaphysis, and the femoral head). A total of 4 mice were studied and 2 femurs for each mouse injected with T-ALL1 subfractions were analysed in this experiment. C. Total leukemic cell number in 2 femurs 72h after CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cell transplantation. Results are the mean  $\pm$  SD of 2 and 4 mice for T-ALL1 and 2 respectively. D. CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> T-ALL1 ( $5 \times 10^4$ /mouse) cells were injected by intravenous (IV) or intrafemoral (IF) routes in NSG mice. Percent of hCD45<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup> leukemic cells was evaluated in BM 9 weeks after transplant of T-ALL1. E. Immunohistochemistry of BM of mice transplanted with  $5 \times 10^4$  CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> T-ALL1 cells. The analysis was performed 3 weeks after transplant. Shown in brown color is the labelling of human leukemic cells with a specific anti-human CD45 antibody.



**Figure 4: CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cell fractions from slow growing T-ALL samples generate leukemia with distinct kinetics and phenotypes.** 5x10<sup>4</sup> (T-ALL5 and T-ALL6), 1-2x10<sup>5</sup> (T-ALL4-6) and 5x10<sup>5</sup> (T-ALL4) of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (red) and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> (blue) T-ALL cells/mouse were injected by iv route into NSG mice. **A.** Engraftment levels for individual mice. Shown are the percent of hCD45<sup>+</sup>hCD7<sup>+</sup> leukemic cells detected by FACS in BM samplings or at euthanasia. **B.** Leukemic cell development ability quantified as in Figure 1B. 3 cell doses of T-ALL5 (1x10<sup>4</sup>, 5x10<sup>4</sup> and 1x10<sup>5</sup>cells /mouse) were tested to obtain the indicated frequency. **C.** CD34 and CD7 expression in T-ALL4-6 leukemic cells from newly diagnosed samples (upper panel, cell sorted fractions) and from human hCD45<sup>+</sup>hCD7<sup>+</sup> cells recovered from BM of xenografted NSG mice (lower panel). CD34 positivity was set according to isotype controls. **D.** Leukemia development of secondary transplants of total BM of primary mice engrafted with CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells from T-ALL4 and T-ALL6 cells. Shown are the percent of human hCD45<sup>+</sup>hCD7<sup>+</sup> leukemic cells at defined sampling time, the last time being at sacrifice. Statistics were determined using the 2-tailed Mann and Whitney test.\*p<0.05.





**Figure 5: CD34 expression unveils leukemic cells with genetic differences and different aggressiveness *in vivo*.** A. Comparative Genomic Hybridization (CGH) analysis of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells at diagnosis and from total human cells recovered after xenograft of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells from T-ALL4 patients. Shown is the profile of the IKZF1 deletion in CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>-derived xenograft leukemia compared to diagnosis. B. Summary of array-CGH results obtained at diagnosis and after xenograft of human CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells. Percentages of cells with genetic alterations were evaluated based on log<sub>2</sub> ratio values. † are shown only genomic alteration in cells detected by array-CGH. Red and blue circles indicate genomic alterations in xenograft derived CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells respectively. Purple circle shown genomic alterations at diagnosis. C. Quantitative analysis of IKZF1 deletions in CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>- and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cell fractions at diagnosis and after primary/secondary xenografts (≥2 mice/experiment) in 2 independent experiments (EXP 1 and 2). The table summarizes the proportion of human IKZF1 deleted cells determined by breakpoint-specific quantitative PCR on total DNA.

harboured additional genetic lesions, indicating that the original CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> fraction contained multiple minor subclones (Supplementary Figure S3B–S3C). In the case of T-ALL6, sorted CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+/−</sup> derived cells recovered from engrafted mice showed identical genetic alterations (Supplementary Table S5) suggesting that long-term developing T-ALLs may as well be genetically homogenous. As expected, T-ALL6 cells derived from primary recipient re-initiated leukemia in secondary faster than primary transplant with a slight delay for CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>−</sup> cells compared to CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells (Figure 4D).

These results show that long-term developing T-ALL may be more heterogeneous than short-term engrafting T-ALL although this is not a general rule. Multiple subclones were found in 2/3 samples unequally distributed within the CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>−</sup> fractions, and their respective frequencies as well as oncogenic events seem to play roles in the specific abilities of CD34<sup>+/−</sup> cells to perpetrate leukemia in xenograft models.

## DISCUSSION

Altogether our results suggest that T-ALL that mediate rapid leukemia development in immunodeficient mice are genetically simple whereas T-ALL taking a longer time to re-initiated leukemia may be genetically more diverse, although genetically homogenous T-ALL can also be detected in this group. Indeed we have found that 3/3 tested short term engrafting T-ALLs contain a predominant genetically defined clone endowed with xenograft leukemia development capacity that segregates with CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>−</sup> cell fractions, although the latter fraction was poorer in such function. In these T-ALL the clonal selection process has probably taken place in patients and the selected molecular mechanisms support leukemia re-establishment in NSG mice. In fact, our work focused on the 60% of paediatric T-ALL that engraft into NSG mice. It is likely that, among non engrafting T-ALL samples there are genomically homogeneous samples whose cell growth are not permissive to mouse microenvironment. In agreement, we observed that one of the 3 samples with long term engrafting potential was also genetically simple indicating that the gene program supporting leukemia development in this patient did not provide strong signals fitting the mouse environment. In this case a minor cross contamination between cell fractions at sorting leading to this result was excluded when CGH-array, original and xenografts phenotypes analyses and leukemia development kinetics were considered altogether.

We recently documented the fact that fast leukemia development in NSG mice does not significantly correlate with bad prognosis in patients [12]. Putting both results together may imply that current treatments are more efficient on genetically homogenous leukemia, making sense with the fact that relapse generally develops as

new leukemia originating from related or unrelated minor subclones [18, 19]. Testing additional samples in relation to their genetics will help answer this question.

Because of the genetic similarities found in the fast engrafting T-ALL, we investigated whether CD34 expression is associated with enhanced leukemia development because of its implication in migration/adhesion [10]. We tested the homing of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>−</sup> cells after transplant into NSG mice but found no relation between CD34 expression and migration properties or BM niching. As array-CGH only detects genomic unbalances, we cannot exclude that other discrete genetic alterations or differential epigenetic states may discriminate CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>−</sup> cell fractions in these rapidly engrafting T-ALL albeit WES analyses of fast engrafting samples confirmed the genetic proximity of those cell fractions. Because we recently described that fast engrafting T-ALL exhibit enhanced NF-κB pathway activation [12], it might be interesting to look into this activation in the CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>−</sup> sub-fractions, also because NF-κB pathway is activated following extracellular signals, such as those provided by inflammation, and we have previously shown that the pro-inflammatory cytokine IL-18, that activates NF-κB, participates into T-ALL development [20].

By contrast, 2/3 tested slow engrafting T-ALL were detected to be genetically diverse compared to rapid engrafting T-ALL. In those cases, CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+/−</sup> cell fractions gave rise to genetically and phenotypically different leukemia in NSG mice. Even though NSG mice are severely immune deficient and thus may allow any leukemic clone to grow, transplantation of multiclonal T-ALL cell fractions, such as those sorted from slow developing T-ALL, results in clonal selection that reduce the intrinsic complexity of T-ALL development and reveal the propensity of certain genetic events to support leukemia development in mice. These results are supported by recent findings showing that NSG mice used as recipients for AML patient blood samples were found to select particular genetic subclones with distinct cell surface phenotypes [21]. Interestingly, starting with the same patient but using different mouse recipients, i.e. NSG mice producing human interleukin 3, stem cell factor and GM-CSF previously described as better recipients for human AML [22], the same authors observed the reproducible selection of different subclones, indicating the important role of the mouse microenvironment in the selection process, at least for myeloid leukemia [21]. Such results would be interesting to document in the case of T-ALL.

Mouse microenvironment may modify T-ALL engraftment ability notably after primary xenograft, independent of clonal genetic selection. In T-ALL3 case, the majority of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+/−</sup> derived-cells isolated from BM of primary mice are CD34<sup>−</sup> and re-initiate leukemia in secondary recipient only with a slight delay for



CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells compared to CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells. This result suggests that CD34 expression is associated with enhanced leukemia development only at diagnosis and not after primary xenograft. This further highlights the relevance to work with fresh patient samples devoid of mouse microenvironment imprinting.

Interestingly CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells of the slow developing T-ALL4 contained a genetic subclone recurrently selected in xenografts that harbours a deletion of the tumour suppressor IKAROS. Loss of IKAROS function is a driver of Notch pathway activation capable to induce T-ALL in mouse and infrequently mutated in patients [14, 16]. This subclone was well-represented (30%) in the CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cell fraction at diagnosis whereas it was very infrequent (0.2%) among CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells. It is likely that this high frequency and maybe the activation of Notch pathway [4] contributed to the selection of this subclone and subsequent secondary transplantation maintained this clone representing 100% of the cells from most primary and secondary grafts. Xenografts from CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells did not select this rare subclone but other ones, in particular bearing a deletion of CTAGE5, a T-lymphoma tumour antigen associated with endoplasmic reticulum that mediate collagen secretion [23]. Interestingly enough, these CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> derived xenografts developed slowly and were depleted in leukemia propagating activity in secondary transplants, outlining the more aggressive behaviour of the IKAROS deleted subclone. This result may suggest that as in breast cancer [24], subclones interactions participate into tumour growth and the lack of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> imprinting on CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells may impair the ability of CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> cells to engraft in secondary recipients.

Overall, our work reveals that T-ALL cell subpopulations isolated based on cell surface markers, such as here CD34 and CD7 expression, and bearing differential leukemia initiating activity may contain distinct clones, with genetic and probably also, but yet not depicted, epigenetic differences. In the most genetically diverse T-ALL xenograft, leukemia development is slow most likely in relation with the frequency of cells with the best fitness to the mouse microenvironment. In this idea, genetically homogenous T-ALL engraft either rapidly or very slowly. As we only studied engrafting samples we cannot exclude that non-engrafting samples could escape this rule. Understanding why those samples do not engraft may help resolve this question and also may improve long term samples engraftment, leading to patient faithful models for testing novel T-ALL therapies.

In general this study allows to better understand leukemia development and heterogeneity when using xenograft models for T-ALL studies. This work also clearly outlines the relation between clonal selection/diversity and T-ALL leukemia initiating concept in T-ALL.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Blood samples from 6 pediatric or young adult T-ALL patients were collected at diagnosis in pediatric hematological departments from hospital Armand Trousseau and hospital Robert Debré (Paris, France) (Supplementary Table S1). Parents or representatives of pediatric patients gave informed consent in accordance with the declaration of Helsinki and national ethic rules. Patients' characteristics are described in Supplementary Table S1. The institutional review board (IRB00003888) of INSERM approved the manipulations of T-ALL samples (project 13-105-2).

### Processing of human T-ALL samples

All experiments were performed with primary newly diagnosed samples unless mentioned. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll centrifugation, immuno-phenotyping was done and cells were used directly or frozen in fetal calf serum (FCS) containing 10% DMSO. T cells were characterized by lymphoid CD7 cell surface expression and normal mature contaminating T-cells were excluded by Flow Activating Cells Sorting (FACS) based on their expression of sCD3<sup>+</sup>(hi) TCRαβ<sup>+</sup>(hi) CD4<sup>+</sup>(hi) or CD8<sup>+</sup>(hi) markers. CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells were enriched using an INFLUX cell sorter (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France). Sorted cells were pelleted for DNA extraction or used for xenograft experiments.

### Flow cytometry

Characterization of xenografted T-ALL samples was performed by flow cytometry. Cells were stained with fluorescein (FITC-), phycoerythrin (PE-), PE-cyanin 7 (PC7-) and allophycocyanin (APC-) conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies specific for CD7, CD34, CD4 and CD8 (Beckman Coulter, Villepinte, France). Cell surface marker expression were analyzed on a FACS Calibur (BD Biosciences) using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

### Mice

NOD.Cg-Prkdc(scid)Il2rg(tm1Wjll)/SzJ (abbreviated NOD/scid/IL-2Rγ null; NSG; from The Jackson Laboratory) were irradiated with 3 Grays (IBL 637 CisBio International, France; dose rate 0.61 Gy/min) and anesthetized with isoflurane before injection of T-ALL cells [9]. CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> leukemic cells from primary newly diagnosed T-ALL samples were injected intravenously (*iv*) through the retro-orbital sinus or in femur in 3 or more NSG mice. To monitor leukemic engraftment, BM samplings were performed after

anesthesia (7.5 mg/mL Ketamin and 0.05% Xylazin) and analgesia (3µg/mL buprenorphin). Human leukemic hCD7<sup>+</sup>/hCD45<sup>+</sup> cells were detected by FACS. Mice were sacrificed when engraftment reached at least 90% or if mice showed clinical signs of illness. At sacrifice, the percentage of leukemic cells was analyzed in total BM and xenografted cells were pelleted for DNA extraction. Frequency of cells able to initiate leukemia in different patient samples was determined using Extreme Limiting Dilution analysis software (ELDA, <http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>). Briefly, positive mice (with over 1% hCD7<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells) number for 3 cell doses of T-ALL1/3 and T-ALL5 was determined at a given time and loaded on ELDA software. Frequency was calculated as previously described [25]. All experimental procedures were performed in compliance with French Ministry of Agriculture regulations (animal facility registration number: A920322) for animal experimentation and in accordance with the local ethical committee (Reference number 12-015).

### ***In vivo* imaging**

CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> leukemic cells were labeled with CFSE (eBioscience, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturers' instructions and injected in NSG mice. 24 and 72h after injection, CFSE<sup>+</sup> cells were detected in the 2 femurs by fiber optic imaging as previously described [13]. Briefly, the knee of anesthetized transplanted mice was flexed and superficially pierced with a 23-gauge needle through the joint. S300 flexible microprobe (Mauna Kea Technologies) was entered and moved slowly inside the femoral cavity all the way up to the femoral head. Video data were acquired with the CellVizio 488 and analyzed with Image Cell software (Mauna Kea Technologies<sup>TM</sup>, France).

### **Immunohistochemistry**

Freshly dissected mouse femurs were fixed in 4% neutral-buffered paraformaldehyde for 24 hours. Fixed specimens were decalcified, embedded in paraffin, sectioned at 4µm, mounted on glass slides, and leukemic cells detected by immunohistochemistry as described below. Briefly, endogenous peroxidase activity was removed with 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 15 minutes. CD45 protein was detected using a 1:1000 dilution of rabbit anti-human CD45 (Abcam, Cambridge, England) for 45 minutes at room temperature. After washing with PBS, HRP secondary anti-rabbit immunoglobulin antibody (ImmPRESS<sup>TM</sup> kit, Vector, Philadelphia, USA) was added for 30 minutes. Finally, staining was revealed using diaminobenzidine (DAB) and sections counterstained using hematoxylin. Control experiments were performed with purified rabbit IgG. Slides were observed using Leica DFC310Fx microscope.

### **DNA extraction and genomic DNA array analysis**

DNA was extracted from patient samples using the QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleic acid quantity was assessed (ND-1000; NanoDrop) and genomic DNAs analysed [11]. Briefly, DNA from CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cell fractions at diagnosis and after xenograft was analyzed by high-density array comparative genomic hybridization (CGH) technologies using the 1 × 1M Microarray SurePrint G3 Catalog (Agilent Technologies) or 4 × 180K according to the manufacturers' recommendations. Analyses were performed using the Genomic Workbench software (Agilent Technologies).

### **PCR for IKZF1 intragenic deletions**

IKZF1 deleted cells were detected in CD7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> fractions from T-ALL3 sample at diagnosis and after xenografts and quantified as previously described [17].

### **Statistical analysis**

For leukemia infiltration into bone marrow, statistical significance of comparisons was determined using the 2-tailed Mann and Whitney non-parametric test using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA). Statistics are evaluated in so far as the number of total or positive mice allows. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; and \*\*\*, P < 0.001 were considered statistically significant. For leukemia initiating cells frequency, statistical analyses were performed using a one-way ANOVA test provided in ELDA software.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank the donors for agreeing to have their cells used for research, and the clinical teams from Hôpital A Trousseau and Hôpital R Debré in Paris, for their dedicated aid in collecting samples. We also thank the members of the LSHL lab for their advice and critical comments during the work. William Hempel helped edit the manuscript. Cell sorting and analysis was performed by Nathalie Dechamps at the common flow cytometry platform of IRCM. Mouse works were greatly facilitated by Christophe Joubert and Julien Tilliet from the animal colony facility of IRCM. Array-CGH analyses were performed at the platform of Institut Universitaire d'Hématologie of Hôpital Saint Louis, Paris, France, thanks to great help from Lucie Hernandez. Clonal tracking was performed at the laboratory of Molecular Genetics of Robert Debré hospital, led by Hélène Cavé. We also thank Jean-Philippe Merlio (BaRITOn laboratory, Bordeaux) for his support during the end of the work.

### **CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.



## GRANT SUPPORT

This work was supported by INSERM, CEA, Université Paris Diderot and Université Paris Sud, Institut National du Cancer (INCA), Cancéropôle d'Ile de France, Région Ile de France, the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC, équipe labellisée) and the Association Laurette Fugain. SP is financed by INCA and LNCC.

## REFERENCES

1. Sloma I, Jiang X, Eaves AC and Eaves CJ. Insights into the stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010; 24:1823-1833.
2. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414:105-111.
3. Van Vlierberghe P and Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical investigation*. 2012; 122:3398-3406.
4. Armstrong F, Brunet de la Grange P, Gerby B, Rouyez MC, Calvo J, Fontenay M, Boissel N, Dombret H, Baruchel A, Landman-Parker J, Romeo PH, Ballerini P and Pflumio F. (2009). NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood*, pp. 1730-1740.
5. Bonnet D and Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*. 1997; 3:730-737.
6. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, Nakamura R, Tanaka T, Tomiyama H, Saito N, Fukata M, Miyamoto T, Lyons B, Ohshima K, Uchida N, Taniguchi S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature biotechnology*. 2007; 25:1315-1321.
7. Chiu PP, Jiang H and Dick JE. Leukemia-initiating cells in human T-lymphoblastic leukemia exhibit glucocorticoid resistance. *Blood*. 2010; 116:5268-5279.
8. Cox CV, Martin HM, Kearns PR, Virgo P, Evely RS and Blair A. Characterization of a progenitor cell population in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007; 109:674-682.
9. Gerby B, Clappier E, Armstrong F, Deswarte C, Calvo J, Poglio S, Soulier J, Boissel N, Leblanc T, Baruchel A, Landman-Parker J, Romeo PH, Ballerini P and Pflumio F. Expression of CD34 and CD7 on human T-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations. *Leukemia*. 2011; 25:1249-1258.
10. Nielsen JS and McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *Journal of cell science*. 2008; 121:3683-3692.
11. Clappier E, Gerby B, Sigaux F, Delord M, Touzri F, Hernandez L, Ballerini P, Baruchel A, Pflumio F and Soulier J. Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *The Journal of experimental medicine*. 2011; 208:653-661.
12. Poglio S, Cahu X, Uzan B, Besnard-Guerin C, Lapillonne H, Leblanc T, Baruchel A, Landman-Parker J, Petit A, Baleyrier F, Amsellem S, Baud V, Ballerini P and Pflumio F. Rapid childhood T-ALL growth in xenograft models correlates with mature phenotype and NF-kappaB pathway activation but not with poor prognosis. *Leukemia*. 2015; 29:977-980.
13. Jaracz-Ros A, Lewandowski D, Barroca V, Lavau C and Romeo PH. MLL-ENL leukemia burden initiated in femoral diaphysis and preceded by mature B-cell depletion. *Haematologica*. 2011; 96:1770-1778.
14. Dumortier A, Jeannot R, Kirstetter P, Kleinmann E, Sellars M, dos Santos NR, Thibault C, Barths J, Ghysdael J, Punt JA, Kastner P and Chan S. Notch activation is an early and critical event during T-Cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice. *Molecular and cellular biology*. 2006; 26:209-220.
15. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA and Downing JR. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007; 446:758-764.
16. Marçais A, Jeannot R, Hernandez L, Soulier J, Sigaux F, Chan S and Kastner P. Genetic inactivation of Ikaros is a rare event in human T-ALL. *Leukemia research*. 2010; 34:426-429.
17. Caye A, Beldjord K, Mass-Malo K, Drunat S, Soulier J, Gandemer V, Baruchel A, Bertrand Y, Cave H and Clappier E. Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2013; 98:597-601.
18. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA and Downing JR. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science (New York, NY)*. 2008; 322:1377-1380.
19. Szczepanski T, van der Velden VH, Waanders E, Kuiper RP, Van Vlierberghe P, Gruhn B, Eckert C, Panzer-Grumayer R, Basso G, Cave H, Stadt UZ, Campana D, Schrauder A, Sutton R, van Wering E, Meijerink JP, et al. Late recurrence of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia frequently represents a second leukemia rather than a relapse: first evidence for genetic predisposition. *Journal of clinical oncology*. 2011; 29:1643-1649.
20. Uzan B, Poglio S, Gerby B, Wu CL, Gross J, Armstrong F, Calvo J, Cahu X, Deswarte C, Dumont F, Passaro D, Besnard-Guerin C, Leblanc T, Baruchel A, Landman-Parker J, Ballerini P, et al. Interleukin-18 produced by bone marrow-derived stromal cells supports T-cell acute leukaemia progression. *EMBO molecular medicine*. 2014; 6:821-834.

21. Klc0 JM, Spencer DH, Miller CA, Griffith M, Lamprecht TL, O'Laughlin M, Fronick C, Magrini V, Demeter RT, Fulton RS, Eades WC, Link DC, Graubert TA, Walter MJ, Mardis ER, Dpersio JF, et al. Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. *Cancer cell*. 2014; 25:379-392.
22. Wunderlich M, Chou FS, Link KA, Mizukawa B, Perry RL, Carroll M and Mulloy JC. AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. *Leukemia*. 2010; 24:1785-1788.
23. Saito K, Yamashiro K, Ichikawa Y, Erlmann P, Kontani K, Malhotra V and Katada T. cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Molecular biology of the cell*. 2011; 22:2301-2308.
24. Cleary AS, Leonard TL, Gestl SA and Gunther EJ. Tumour cell heterogeneity maintained by cooperating subclones in Wnt-driven mammary cancers. *Nature*. 2014; 508:113-117.
25. Hu Y and Smyth GK. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of immunological methods*. 2009; 347:70-78.

## Annexe 4 :

From [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org) by guest on June 20, 2019. For personal use only.



### IMMUNOBIOLOGY AND IMMUNOTHERAPY

## Fratricide-resistant CD1a-specific CAR T cells for the treatment of cortical T-cell acute lymphoblastic leukemia

Diego Sánchez-Martínez,<sup>1</sup> Matteo L. Baroni,<sup>1</sup> Francisco Gutierrez-Agüera,<sup>1</sup> Heleia Roca-Ho,<sup>1</sup> Oscar Blanch-Lombarte,<sup>2</sup> Sara González-García,<sup>3</sup> Montserrat Torredadell,<sup>4,5</sup> Jordi Junca,<sup>6</sup> Manuel Ramírez-Orellana,<sup>7</sup> Talía Velasco-Hernández,<sup>1</sup> Clara Bueno,<sup>1</sup> José Luís Fuster,<sup>8,9</sup> Julia G. Prado,<sup>2</sup> Julien Calvo,<sup>10</sup> Benjamin Uzan,<sup>10</sup> Jan Cools,<sup>11</sup> Mireia Camos,<sup>4,5</sup> Françoise Pflumio,<sup>10</sup> María Luisa Toribio,<sup>3</sup> and Pablo Menéndez<sup>1,12,13</sup>

<sup>1</sup>Josep Carreras Leukemia Research Institute, Department of Biomedicine, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>AIDS Research Institute IrsiCaixa, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa CSIC-UAM, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Haematology Laboratory, Institut de Recerca, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>6</sup>Institut Català d'Oncologia-Hospital Germans Trias i Pujol, Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain; <sup>7</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; <sup>8</sup>Sección de Oncohematología Pediátrica, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain; <sup>9</sup>Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria, Murcia, Spain; <sup>10</sup>Université Paris Diderot and Université Paris-Sud, Unité Mixte de Recherche 967, INSERM, U967, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>11</sup>KU Center for Human Genetics and VIB Center for Cancer Biology, Leuven, Belgium; <sup>12</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red-Oncología, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain; and <sup>13</sup>Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona, Spain

#### KEY POINTS

- CD1a CARTs exhibit specific and robust cytotoxicity in vitro and in vivo using both T-ALL cell lines and primary coT-ALL cells.
- CD1a CARTs are fratricide resistant and exhibit long-term persistence in vivo with antileukemic activity in rechallenge experiments.

**Relapsed/refractory T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) has a dismal outcome, and no effective targeted immunotherapies for T-ALL exist. The extension of chimeric antigen receptor (CAR) T cells (CARTs) to T-ALL remains challenging because the shared expression of target antigens between CARTs and T-ALL blasts leads to CART fratricide. CD1a is exclusively expressed in cortical T-ALL (coT-ALL), a major subset of T-ALL, and retained at relapse. This article reports that the expression of CD1a is mainly restricted to developing cortical thymocytes, and neither CD34<sup>+</sup> progenitors nor T cells express CD1a during ontogeny, confining the risk of on-target/off-tumor toxicity. We thus developed and preclinically validated a CD1a-specific CAR with robust and specific cytotoxicity in vitro and antileukemic activity in vivo in xenograft models of coT-ALL, using both cell lines and coT-ALL patient-derived primary blasts. CD1a-CARTs are fratricide resistant, persist long term in vivo (retaining antileukemic activity in re-challenge experiments), and respond to viral antigens. Our data support the therapeutic and safe use of fratricide-resistant CD1a-CARTs for relapsed/refractory coT-ALL. (*Blood*. 2019;133(21):2291-2304)**

### Introduction

T-cell lineage acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a malignant disorder resulting from leukemic transformation of thymic T-cell precursors.<sup>1</sup> T-ALL is phenotypically and genetically heterogeneous and is commonly associated with genetic alterations/mutations in transcription factors involved in hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) homeostasis and in master regulators of T-cell development.<sup>2</sup> T-ALL comprises 10% to 15% and 20% to 25% of all acute leukemias diagnosed in children and adults, respectively,<sup>3,4</sup> with a median diagnostic age of 9 years.<sup>5-7</sup> Intensive chemotherapy regimens have led to the improved survival of patients with T-ALL; however, the event-free and overall (OS) survival remains <70%, and relapsed/refractory (R/R) T-ALL has a particularly poor outcome. There are currently no potential curative options beyond hematopoietic cell transplantation and conventional chemotherapy,

which is linked to large trade-offs in toxicities,<sup>4,8</sup> reinforcing the need for novel targeted therapies.

Immunotherapy has generated unprecedented expectations in cancer treatment and relies on the immune system as a powerful weapon against cancer. In recent years, adoptive cellular immunotherapy based on chimeric antigen receptors (CARs) has shown great potential. CAR therapy redirects genetically modified T cells to specifically recognize and eliminate specific antigen-expressing tumor cells in a major histocompatibility complex-independent fashion.<sup>9,10</sup> The success of CAR T cells (CARTs) redirected against CD19 or CD22 is now indisputable for B-cell malignancies (mainly B-ALL).<sup>11-14</sup> However, strategies targeting T-cell malignancies using CARTs remain challenging because of the shared expression of target antigens between CARTs and T-lineage tumoral cells. In this regard, CARTs against pan T-cell antigens have



2 major drawbacks: (1) CARTs self-targeting/fratricide; and (2) T-cell aplasia, leading to life-threatening immunodeficiency.<sup>15-17</sup>

Recent elegant preclinical studies showed that T cells transduced with either CD7, CD3, CD5, or T-cell receptor CARs (the most expressed pan T-cell antigens) efficiently eliminate T-ALL blasts *in vitro* and are able to control the disease *in vivo*,<sup>15-20</sup> leading very recently to pioneering phase 1 clinical trials with CARTs for T-ALL (#NCT03690011 and #NCT03590574). However, innovative approaches, such as CRISPR/Cas9 genome editing or protein expression blockers, seem needed for disruption of the target antigen in T cells before CAR transduction to avoid extensive self-antigen-driven fratricide.<sup>15-17,19</sup>

Gene expression profiling and multicolor immunophenotyping classify T-ALLs into distinct subgroups that mostly reflect a particular stage of differentiation arrest.<sup>21</sup> Cortical T-ALL (coT-ALL) is a major subgroup of T-ALL characterized by the surface expression of CD1a, consistent with a developmental arrest at the cortical stage.<sup>22-24</sup> There are 4 CD1 isoforms (CD1a, CD1b, CD1c, and CD1d) in humans, whereas only the CD1d isoform is expressed in the mouse.<sup>25</sup> Upon recognition of the CD1 ligand complex by the T-cell receptor, CD1-dependent T cells are activated in a variety of immunological contexts. Loss-of-function studies revealed that CD1-deficient mice may be more susceptible to some viruses, bacteria, and protozoa.<sup>26,27</sup> Unfortunately, the role of CD1 isoforms in human infection remains elusive. CD1a is a lipid-presenting molecule whose expression is essentially restricted to coT-ALL and Langerhans cell (LC) histiocytosis and is practically absent in human tissues with the exception of developing cortical thymocytes and LC.<sup>28,29</sup> Here, we tested the feasibility of targeting CD1a<sup>+</sup> coT-ALL using CD1a CARTs. We report that CD1a-specific CARTs exhibit robust cytotoxicity against CD1a<sup>+</sup> coT-ALL cell lines and primary coT-ALL cells, both *in vitro* and *in vivo*. CD1a CARTs are fratricide resistant and remain functional *in vivo* after 13 weeks, as shown by leukemia rechallenge experiments. Fratricide-resistant CD1a CARTs thus represent a safe and innovative adoptive immunotherapy for coT-ALL and potentially for other CD1a<sup>+</sup> tumors such as LC histiocytosis.

## Methods

### CD1a-scFv generation and CAR design

The CD1a-specific single-chain variable fragment (scFv) derived from the NA1/34.HLK clone of CD1a-specific antibody was obtained by using commercial synthesis (MilliporeSigma) with the mouse IgG Library Primer Set (Progen). It was cloned into a pCCL lentiviral-based second-generation CAR backbone containing a human CD8 transmembrane domain, human 4-1BB and CD3z endodomains, and a T2A-green fluorescent protein (GFP) cassette. Identical lentiviral vectors expressing either GFP alone (MOCK) or CD22 CAR backbone were used as controls.

### CAR-expressing lentiviral production, T-cell transduction, activation, and expansion

CAR-expressing viral particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G glycoprotein were generated in 293T cells by using standard polyethylenimine transfection protocols and

concentrated by ultracentrifugation, as previously described.<sup>30</sup> Viral titers were consistently in the range of 10<sup>8</sup> TU/mL. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats from healthy volunteers by using Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. Buffy coats were obtained from the Barcelona Blood and Tissue Bank upon institutional review board approval (HCB/2018/0030). T cells were activated by plate-bound anti-CD3 (OKT3) and anti-CD28 (BD Biosciences) antibodies for 2 days and were then transduced with CAR-expressing lentivirus (multiplicity of infection = 10) in the presence of interleukin-7 (IL-7) and IL-15 (10 ng/mL; Miltenyi Biotec).<sup>16,18</sup> The cell surface expression of CD1aCAR was traced by fluorescence-activated cell sorting (FACS) expression of GFP and by using AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Proper activation of CAR-transduced T cells was shown by staining for CD25 and CD69 after 2-day expansion.

### Immunophenotyping of healthy CD34<sup>+</sup> progenitors, T cells, and primary T-ALL samples

The expression of CD1a antigen in CD34<sup>+</sup> HSPCs, CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup> thymic T-cell progenitors, and CD3<sup>+</sup> T cells was prospectively analyzed in fresh human thymus, fetal liver and bone marrow (BM), cord blood, and adult BM and peripheral blood (PB) (n = 3). Fetal tissue was collected as previously described<sup>31,32</sup> from developing embryos aborted at 18 to 22 weeks of pregnancy, obtained from the MRC/Wellcome Trust Human Developmental Biology Resource upon informed consent and approval by our local ethics committee (CMRB-CEIC-26/2013). Neonatal and adult tissues were obtained from the Barcelona Blood and Tissue Bank upon institutional review board approval (HCB/2018/0030). Primary T-ALL samples and diagnostic immunophenotyping data (n = 38) were obtained from the Spanish hospitals Sant Joan de Déu, Germans Trias i Pujol, Santa Creu i San Pau (Barcelona), Niño Jesús (Madrid), and Virgen de la Arrixaca (Murcia). Supplemental Table 1 (available on the *Blood* Web site) shows the main clinical-biological features of the CD1a<sup>++</sup> coT-ALL cases. For immunophenotyping of T-ALL primary samples, the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) were used: anti-CD2-PE, CD7-FITC/PE, CD13-PerCP-Cy5.5, CD34-APC, CD3-PE, CD5-FITC, CD4-BV-421, CD8-APC-Cy7, CD45-AmCyan, CD1a-BV-421/APC/PE, CD33-APC, and CD123-APC (BD Biosciences). Isotype-matched, nonreactive fluorochrome-conjugated mAbs were always used as a fluorescence reference. Briefly, 5 × 10<sup>5</sup> PBMCs were incubated with erythrocyte-lysing solution (BD Biosciences) for 10 minutes and then stained with mAbs (20 minutes at 4°C in the dark). Stained cells were washed in phosphate-buffered saline and FACS-analyzed on a FACSCanto-II cytometer equipped with FACSDiva software (BD Biosciences).<sup>33-35</sup> CD1a antigen density was determined by using BD QuantiBRITE PE, as described elsewhere.<sup>36</sup>

### *In vitro* cytotoxicity assays and cytokine release determination

The Jurkat, MOLT4, and NALM6 cell lines were purchased from DSMZ and expanded according to DSMZ recommendations. Luciferase (Luc)/GFP-expressing cells were stably generated by retroviral transduction and FACS purification of GFP-positive cells.<sup>37</sup> Target cells (cell lines and primary T-ALL blasts) were labeled with 3 μM eFluor 670 (eBioscience) and incubated with

CD1a, CD22, or MOCK CARTs at different effector:target (E:T) ratios for the indicated time periods. CART-mediated cytotoxicity was determined by analyzing the residual alive (7-amino actinomycin D negative) eFluor 670–positive target cells at each time point and E:T ratio. Absolute cell counts were determined by using TruCount absolute count beads (BD Biosciences). In addition, FACS-sorted CD3<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> mature T cells from PB of patients with coT-ALL at presentation were activated, transduced with CD1a CAR, and tested against their eFluor 670–labeled autologous-matched CD1a<sup>+</sup> coT-ALL blasts. Leukemic blasts were never FACS-sorted in primary samples. The production of the proinflammatory cytokines IL-2, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), and interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) was measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay (BD Biosciences) in supernatants harvested after 16 hours.

### In vivo Jurkat and T-ALL patient-derived xenograft models

Six- to 12-week-old nonobese diabetic-Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) mice (The Jackson Laboratory) were bred and housed under pathogen-free conditions in the animal facility of the Barcelona Biomedical Research Park. Mice were irradiated (2 Gy) and IV transplanted with  $3 \times 10^6$  Luc/GFP–expressing Jurkat cells or with  $1 \times 10^6$  primary cortical CD1a<sup>+</sup> T-ALL blasts (primary and primograft-expanded).<sup>38</sup> Between  $1.5$  and  $5 \times 10^6$  CD1a or MOCK CARTs were IV infused 3 days later. When Luc/Jurkat cells were used, tumor burden was followed by bioluminescence (BLI) using the Xenogen IVIS 50 Imaging System (PerkinElmer). To measure luminescence, mice were given 150 mg/kg of D-luciferin intraperitoneally, and tumor burden was monitored at the indicated time points. Living Image software (PerkinElmer) was used to visualize and calculate total luminescence. Tumor burden of primary coT-ALL samples was followed up by biweekly bleeding and FACS analysis. Mice were euthanized when MOCK CART-treated animals were leukemic, and tumor burden (hHLA-ABC<sup>+</sup>hCD45<sup>+</sup>hCD3<sup>-low</sup>hCD1a<sup>+</sup> graft) and effector T persistence (hHLA-ABC<sup>+</sup>hCD45<sup>+</sup>hCD3<sup>+</sup>hCD1a<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>) was analyzed in BM, PB, and spleen according to FACS. In rechallenge experiments, leukemia-free animals that had received an infusion of CD1a CARTs 5 to 7 weeks before were re-infused with either  $1.5 \times 10^6$  Luc/Jurkat cells or  $1 \times 10^6$  CD1a<sup>+</sup> coT-ALL primary cells, and disease reappearance was followed up by BLI and FACS. All procedures were performed in compliance with the institutional animal care committee of the Barcelona Biomedical Research Park (DAAM7393).

### ELISpot

Enzyme-linked immunospot assay (ELISpot) plates (MilliporeSigma) were coated with anti-human IFN- $\gamma$  antibody (1-D1K; Mabtech) and kept overnight at 4°C. Plates were then washed 6 times with PBS containing 1% fetal calf serum, and cells from 3 independent donors were then plated at  $5$  to  $10 \times 10^5$  cells/well and cultured in triplicate for 20 hours at 37°C and 5% carbon dioxide. We measured IFN- $\gamma$ –secreting cells in response to CEF at 1  $\mu$ g/mL, a peptide pool of T-cell epitopes of cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), and flu virus, and to staphylococcal enterotoxin B at 1  $\mu$ g/mL as a positive control. Plates were then revealed with biotinylated anti-human IFN- $\gamma$  and streptavidin-alkaline phosphatase (Mabtech), as previously described.<sup>39,40</sup> The frequency of IFN- $\gamma$ –secreting cells was quantified by using ImmunoCapture and ImmunoSpot software

(both, Cellular Technology Limited) to calculate the number of IFN- $\gamma$  spot-forming units per  $10^5$ .

### Statistical analysis

Data from at least 3 individual donors are shown in all figures, and experimental duplicates were always performed. At least 5 animals were used in each in vivo condition. All *P* values were calculated by using the unpaired 2-tailed Student *t* test with Prism software (GraphPad Software). OS of mice was determined by using a Mantle-Cox test. *P* < .05 was considered statistically significant.

## Results

### CD1a specifically marks coT-ALL blasts

The shared expression of target antigens between CARTs and T-lineage blasts has limited immunotherapy approaches in T-ALL due to CART fratricide and potential life-threatening T-cell aplasia. CD1a antigen was expressed in coT-ALLs, a major subset of T-ALLs (Figure 1A-B; supplemental Figure 1), and retained at relapse (Figure 1C). Similar to previous studies,<sup>41–43</sup> in our cohort of patients with T-ALL (*n* = 38), 75% (*n* = 29) were phenotypically defined as CD1a<sup>+</sup> coT-ALL; however, the expression of CD1a was homogeneous in only 50% (19 of 38) of the patients with T-ALL. Importantly, CD1a was absent in T cells in all extrathymic tissues (Figure 1D),<sup>28</sup> and steady-state CD34<sup>+</sup> HSPCs also lacked CD1a expression in multiple hematopoietic sites across ontogeny. T-cell development was initiated within the thymus by a first colonizing CD34<sup>high</sup>CD7<sup>-</sup>CD1a<sup>-</sup> primitive HSPC with lymphomyeloid potential, which then differentiated in response to the thymic microenvironment into CD34<sup>high</sup>CD7<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> early T-cell progenitors (ETP).<sup>44</sup> As thymic differentiation progressed, ETPs maintained CD7 expression and gradually lost CD34 expression, whereas CD1a expression emerged and was transiently confined to cortical thymocytes<sup>45</sup> (Figure 1E). Within the CD34<sup>+</sup> thymic HSPC population, ~50% is represented by precortical CD34<sup>high</sup>CD7<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> ETPs (Figure 1F, blue cells), allowing us to hypothesize that CD1a may be a feasible and safe immunotherapeutic target for R/R coT-ALL.<sup>3,41,46,47</sup>

### CD1a-redirected T cells (CD1a CARTs) expand without T-cell fratricide

We designed a second-generation CD1a CAR consisting of anti-CD1a scFv, a CD8 transmembrane spacer, and intracellular signaling domains from 4-1BB and CD3z coupled in-frame with GFP through a T2A sequence (Figure 2A). The expression of the CD1a CAR was easily detected through coexpression of both scFv and GFP in 293T cells (Figure 2B) and in primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell subsets (Figure 2C). Importantly, activated (CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) CD1a CARTs (Figure 2D) continuously expanded 200-fold over a 12-day period, similar to MOCK T cells (Figure 2E), showing that redirecting CARTs against CD1a antigen does not induce T-cell fratricide.

### CD1a CARTs specifically eradicate T-ALL cell lines and primary blasts in vitro

An initial analysis of CD1a density in cell surface confirmed the high expression level of the target antigen specifically in coT-ALL primary cells, primografts, and cell lines (Figure 2F-G), further validating CD1a as an immunotarget. Consequently, CD1a



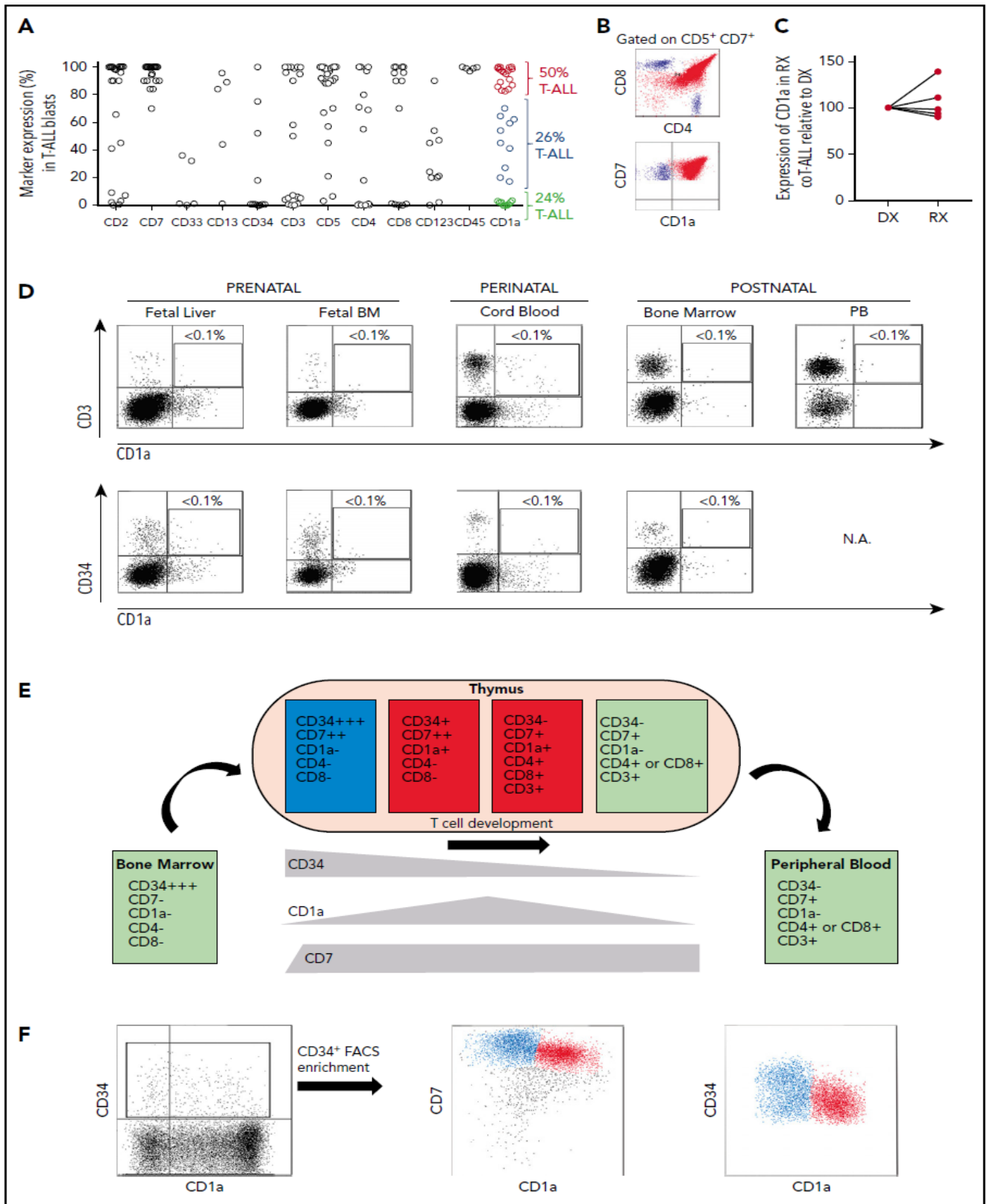


Figure 1.



CARTs were first tested *in vitro* using the CD1a<sup>+</sup> T-ALL cell lines Jurkat and MOLT4, and the B-ALL cell line NALM6 as a negative control. Compared with control CARTs (either MOCK T cells or CD22 CARTs), CD1a CARTs specifically eliminated CD1a<sup>+</sup> T-ALL cells in a manner dependent on the E:T ratio. A relatively low E:T ratio of 2:1 or 4:1 induced 50% to 90% specific cell lysis in 16-hour assays (Figure 2H; supplemental Figure 2). Importantly, CD1a<sup>+</sup> T-ALL cells barely survived exposure to CD1a CARTs in a 72-hour absolute number assay at a 1:1 E:T ratio (Figure 2I-J). CD1a CARTs produced high levels of the proinflammatory cytokines IL-2, TNF $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  on coculture with CD1a<sup>+</sup> cell lines, confirming their cytotoxicity (Figure 2K).

To further address their ability to eliminate primary tumors, CD1a CARTs were cocultured with primary coT-ALL samples (either freshly harvested or in a patient-derived xenograft [PDX] model), with a proportion of CD1a<sup>+</sup> blasts ranging between 80% and 99% (Figure 3A). Compared with MOCK T cells, CD1a CARTs specifically eliminated primary CD1a<sup>+</sup> coT-ALL cells in 48-hour cytotoxicity assays at a 4:1 E:T ratio (Figure 3B-C). BM normal hematopoietic cells (CD1a<sup>-</sup>) as well as CD1a<sup>-</sup> T-ALL blasts were not lysed by CD1a CARTs, further confirming the specificity of the CD1a CAR (Figure 3C; supplemental Figure 5). High-levels of IFN- $\gamma$  and TNF $\alpha$  were also secreted on coculture with CD1a<sup>+</sup> primary T-ALL cells (Figure 3D). Collectively, CD1a CARTs have a potent and specific antileukemic activity against coT-ALL cell lines and primary blasts *in vitro*.

### CD1a CARTs exhibit potent antileukemic activity *in vivo*

We next evaluated the activity of CD1a CARTs *in vivo* using both Luc-expressing Jurkat T-ALL cells (Figure 4; supplemental Figure 3) and a primary coT-ALL xenograft model<sup>38</sup> (Figure 5). NSG mice were transplanted with  $3 \times 10^6$  Luc-expressing Jurkat cells 3 days before IV infusion of either  $2 \times 10^6$  or  $5 \times 10^6$  CD1a (or MOCK) CARTs, and leukemia establishment was followed up weekly by using BLI. In contrast to the mice receiving MOCK T cells, which showed massive tumor burden by BLI, those mice given CD1a CARTs were practically leukemia free by day 25. The control of leukemia progression was CD1a CART cell dose-dependent. Flow cytometry analysis of tumor burden in PB confirmed the BLI data. Importantly, FACS analysis revealed T-cell persistence in all hematopoietic tissues analyzed; however, we found a significantly increased biodistribution of CD1a-directed effector T cells in BM and spleen, compared with the biodistribution of MOCK T cells, indicative of an active control of disseminated leukemia by CD1a CARTs.

In a clinically more relevant PDX model of coT-ALL, NSG mice were first transplanted with  $1 \times 10^6$  primary CD1a<sup>+</sup> T-ALL blasts followed 3 days later by infusion of  $1 \times 10^6$  CD1a (or MOCK) CARTs, and leukemia engraftment was then followed up bi-weekly by bleeding and end point BM analysis (Figure 5A).

Engraftment of CD1a<sup>+</sup> coT-ALL cells gradually increased over time, both in BM ( $50\% \pm 13\%$  and  $55\% \pm 11\%$  on weeks 6 and 9, respectively) (Figure 5B) and PB ( $4.4\% \pm 2\%$  and  $18\% \pm 6\%$  on weeks 6 and 9) (Figure 5C) in MOCK T-cell-treated PDXs and was associated with a significantly lower 9-week OS ( $42\%$  vs  $100\%$ ;  $P = .01$ ) (Figure 5D). In contrast, CD1a CARTs fully abolished T-ALL growth/engraftment even 9 weeks after CART infusion ( $0.36\%$  and  $0\%$  T-ALL blasts in BM and PB), and, importantly, they persisted in PB and BM over time (Figure 5E).

### *In vivo* persistent CD1a CARTs are functional in rechallenge assays

Because the persistence of CARTs in hematopoietic tissues is a major biological parameter for their clinical success, we next assessed whether CD1a CARTs persisting after 40 to 50 days remained functional and efficient in controlling T-ALL progression. To do this, T-ALL-transplanted mice in which the leukemia was cleaned on treatment with CD1a CARTs were rechallenged with either Luc/Jurkat cells (Figure 6A-D) or primary T-ALLs from primografts (Figure 6E-G). Opposite to control mice in which the secondary leukemias rapidly (as soon as 2 weeks after) and massively engrafted, T-ALL engraftment was barely detectable according to either BLI or FACS in the Jurkat or primograft model after 6 weeks. Importantly, FACS analysis confirmed persisting effector T cells in PB, BM, and spleen of rechallenged animals, further supporting the functional effect of CD1a CARTs in controlling disease progression in rechallenge assays.

### Patient-derived CD1a CARTs specifically target autologous CD1a<sup>+</sup> blasts and retain antiviral activity

The proper choice of the target antigen and avoiding T-cell fratricide are crucial for the success of CARTs in T-ALL. Accordingly, we examined whether PB-derived mature CD3<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup> T cells from patients with coT-ALL can be isolated and genetically modified to express CD1a CAR. For this experiment, CD3<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup> T cells from patients were isolated (>95% purity; data not shown), activated with CD3/CD28, and lentivirally transduced (31%-70% transduction) with CD1a CAR or MOCK. We next investigated the cytolytic capacity of CD1a CARTs derived from primary T-ALLs against active T-ALL patient-matched PBMCs (Figure 7A). Total PBMCs were used as targets because this method allows assessment of both the autologous cytotoxicity potential and the degree of fratricide. Within eFluor 670-labeled target PBMCs, the great majority (~75%) are CD1a<sup>+</sup> blasts, and ~15% are CD3<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup> mature T cells (Figure 7B). Compared with MOCK T cells, the CD1a CARTs exhibited massive and specific cytolytic capacity against autologous CD1a<sup>+</sup> blasts but not against CD1a<sup>-</sup> mature T cells (Figure 7C), further showing that CD1a CARTs are fratricide resistant.

**Figure 1. CD1a expression in T-ALL and normal hematopoiesis and thymopoiesis.** (A) Immunophenotype of *de novo* T-ALL samples ( $n = 38$ ) for the indicated markers. Red and blue circles identify CD1a<sup>+/++</sup> and CD1a<sup>low/+</sup> coT-ALL patients, respectively. Green circles depict non-coTALL patients. (B) Representative FACS dot plot of a patient with coT-ALL. Red cells are CD7<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> coT-ALL blasts, and blue cells are normal mature T cells (CD3<sup>+</sup> CD7<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup>, either CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>) present in the diagnostic (DX) sample. (C) CD1a is retained at relapse (RX) ( $n = 5$  DX-RX coT-ALL pairs). Data shown as CD1a expression in RX samples relative to the DX-matched samples (DX shown as 100% expression). (D) T cells and CD34<sup>+</sup> HSPCs do not express CD1a across ontogeny. (E) Scheme depicting the phenotype of developing thymic T-cell populations. (F) Representative FACS for precortical (CD34<sup>high</sup> CD7<sup>++</sup> CD1a<sup>-</sup>) and cortical (CD34<sup>+</sup> CD7<sup>++</sup> CD1a<sup>+</sup>) thymocytes.

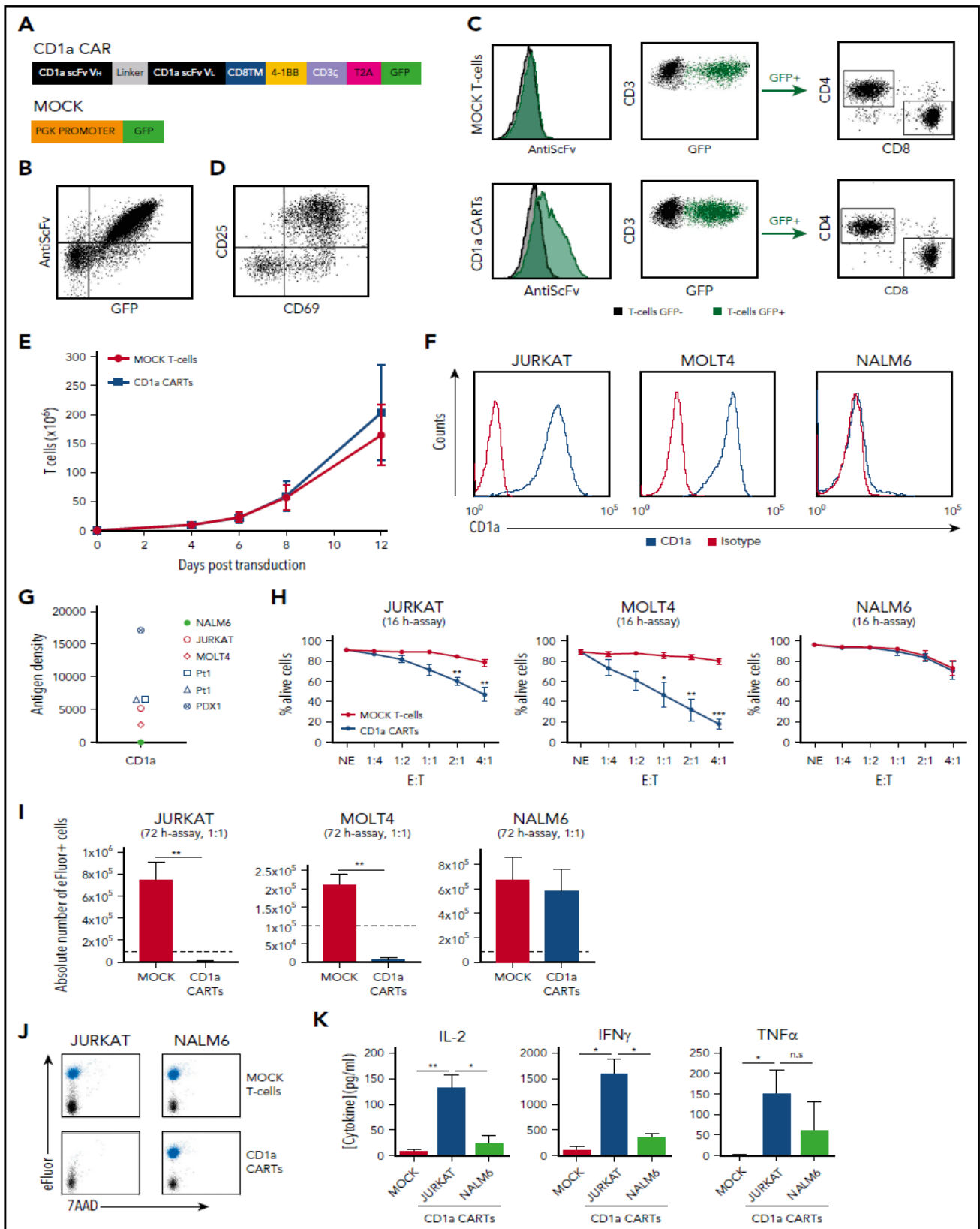


Figure 2.



To further assess the potential thymic toxicity of CD1a CARTs, we next used human normal fetal thymus-derived CD7<sup>+</sup> thymocytes as target cells. Only the CD1a<sup>+</sup> cortical thymocytes (red) were eliminated by the CD1a CARTs, whereas developmentally earlier and later CD1a<sup>-</sup> (blue) thymic T-lineage populations (CD7<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> and CD7<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>) were not targeted (supplemental Figure 4), limiting the on-target/off-tumor effects to a developmentally transient thymic population of cortical thymocytes. We finally sought to determine whether CD1a CARTs can protect, by themselves, the host by targeting the most common pathogens causing viremia in immunosuppressed patients. To do this, we tested the reactivity of CD1a CARTs to CMV, EBV, and flu antigens (CEF) and quantified the SFCs by INF- $\gamma$  ELISpot. Both MOCK T cells and CD1a CARTs responded very similarly to stimulation with viral peptides, suggesting that CD1a CARTs retain antiviral activity (Figure 7D).

## Discussion

T-ALL is an aggressive hematological cancer with poor clinical outcome, both in children and adults, for which there is currently no targeted therapy.<sup>46,47</sup> Salvage chemotherapy regimens induce remissions in only 20% to 50% of R/R cases, and allogeneic HSPC transplantation is largely associated with toxicities.<sup>4</sup> Despite intensive multiagent chemotherapy protocols, 5-year survival remains ~50%,<sup>4,41</sup> reinforcing the need for novel targeted therapies. Similarly, the only targeted therapies previously used for eradication of malignant T cells, with suboptimal clinical outcome, are the ricin A chain toxin-conjugated mAbs anti-CD5 and anti-CD7.<sup>48,49</sup>

Adoptive cellular immunotherapy based on CARs holds great promise in cancer-targeted treatment. T cells can be modified to specifically recognize and eliminate tumor cells through the expression of CARs, which redirect genetically modified T cells to specific antigen-expressing tumor cells in a major histocompatibility complex-independent manner.<sup>9,10</sup> However, broadening the scope of CARTs to treat T-ALL and T-cell lymphomas has proven challenging because of the shared expression of target antigens between CARTs and T-lineage tumoral cells.<sup>15-20</sup> Accordingly, 2 major stumbling blocks need to be overcome for the use of CARTs for T-ALL and T-cell lymphoma: first, CARTs self-targeting/fratricide occurs when CARTs recognize pan T-cell antigens; and second, CARTs targeting pan T-cell antigens will induce T-cell aplasia, leading to a life-threatening immunodeficiency.<sup>15-19</sup>

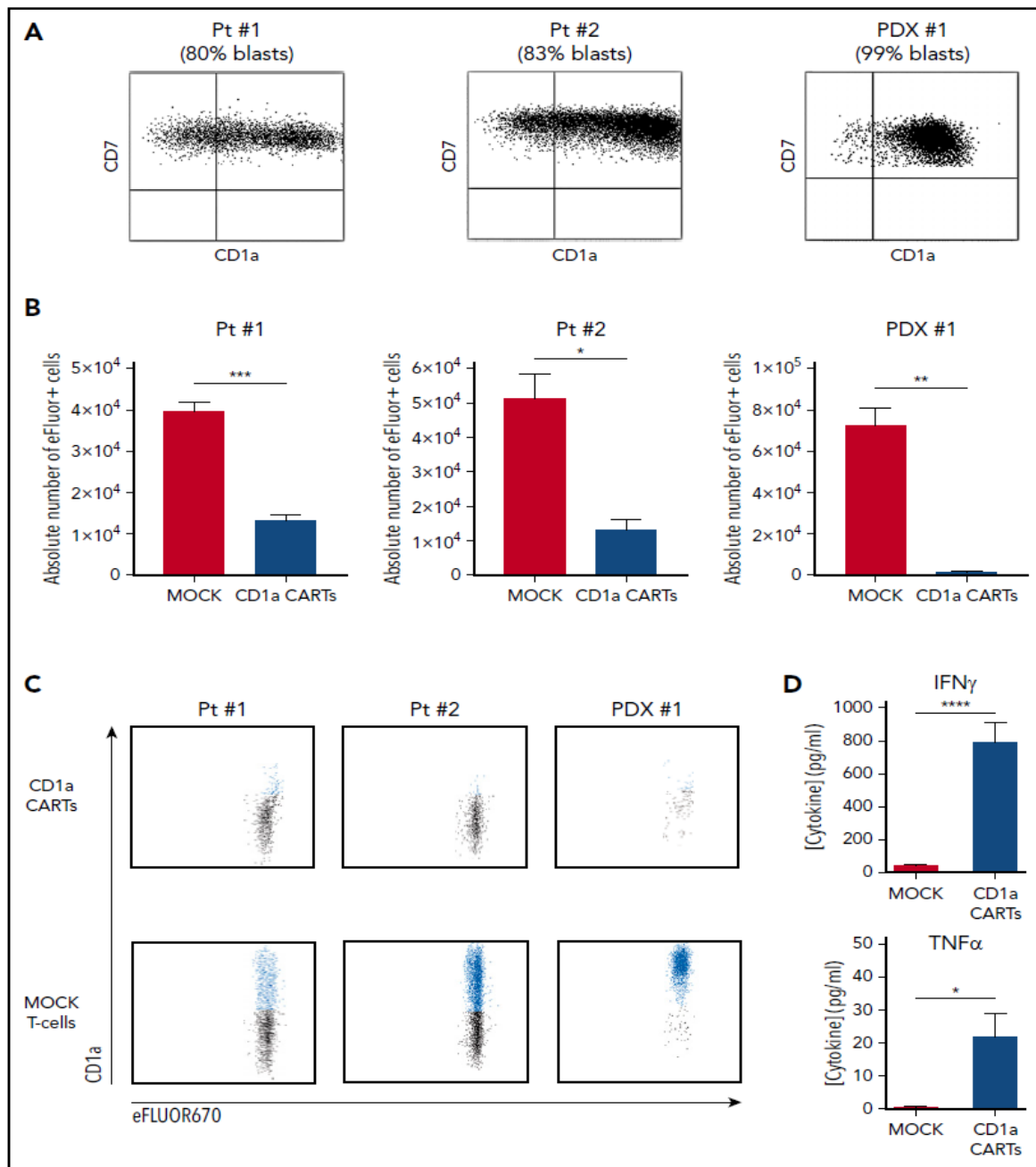
We hypothesized that the choice of the antigen against which we wish to re-direct T cells would represent a major advance to solving the problems associated with the shared expression of T-cell markers between normal and malignant T cells. CD1a is a lipid-presenting molecule whose expression is basically restricted to coT-ALL, retained at relapse, and is practically

absent in human tissues with the exception of cortical thymocytes, skin LC, and some circulating myeloid dendritic cells during development.<sup>28,29,50,51</sup> Given this scenario, we opted for the CD1a antigen as a feasible and safe target for CAR immunotherapy in R/R coT-ALL, the most common subtype of T-ALL.<sup>21,28,52</sup>

We developed and functionally characterized CD1a-specific CARTs, which displayed robust cytotoxicity against T-ALL cell lines and primary CD1a<sup>+</sup> coT-ALL cells, both in vitro and in vivo in xenograft models. The CD1a CARTs continuously expanded 200-fold, similar to MOCK T cells, showing that redirecting CARTs against CD1a antigen does not induce T-cell fratricide. Also, the use of CD1a CARTs for coT-ALL bypasses the need for sophisticated genome editing-based disruption of target antigens in T cells before CAR transduction as a strategy to avoid self-antigen-driven fratricide.<sup>15-17,19</sup> We further showed that in steady-state hematopoiesis, CD1a is exclusively expressed in a subset of CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup> cortical thymic T-progenitors, whereas earlier CD34<sup>high</sup>CD7<sup>high</sup> T-progenitors lack CD1a. In addition, neither normal CD34<sup>+</sup> HSPCs nor mature T cells from multiple tissues express CD1a during ontogeny, thereby minimizing the risk of on-target/off-tumor toxicity. Indeed, when human fetal thymus-derived CD7<sup>+</sup> thymocytes were exposed to CD1a CARTs, only the CD1a<sup>+</sup> cortical thymocytes were eliminated by the CD1a CARTs. Developmentally earlier and later thymic T-lineage populations (CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup>) were not targeted, limiting the on-target/off-tumor effects to a developmentally transient thymic population of cortical thymocytes and further confirming the fratricide-resistant nature of CD1a CARTs.

Regarding safety, we do not expect irreversible toxicities or immunodeficiency attributed to CD1a CARTs for the following reasons: (1) CD1a<sup>+</sup> thymocytes represent a transient and thymus-restricted population, eventually regenerated by "nontargetable" upstream CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> T-cell progenitors physiologically/constantly maturing into functional T cells; (2) CD1a CARTs themselves respond normally to viral antigens and therefore are likely to be protective against pathogens; (3) the clinical use of specific antibodies against CD5 or CD7<sup>48</sup> did not reveal severe or irreversible toxicities; and (4) postnatal thymectomy does not lead to immunodeficiency in humans,<sup>53,54</sup> likely because thymic emigrants generated early in life persist for decades,<sup>53</sup> suggesting that potential transient elimination of thymic progenitors by CD1a CARTs in pediatric patients would not compromise the complete antiviral T-cell repertoire in adult life. Nonetheless, whether infants could eventually develop a premature immunosenescence later in life merits caution, as this finding was reported for infants thymectomized before 1 year of age.<sup>55-59</sup> Fortunately, however, T-ALL is extremely infrequent in infants. Safer ultimate strategies would include the implementation of an inducible molecular switch to control potential toxicities

**Figure 2. CD1a CARTs specifically target and eliminate CD1a<sup>+</sup> T-ALL cell lines in vitro.** (A) Scheme of the CD1aCAR construct used. (B) CAR detection in 293T cells using an anti-scFv mAb and GFP. (C) Representative CAR transduction and detection in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (n = 6). (D) Proper T-cell activation (n = 3). (E) Robust expansion of activated T cells transduced with either MOCK or CD1a CAR reveals no signs of fratricide (n = 4). (F) Surface expression of CD1a (blue line) in Jurkat, MOLT4, and NALM6 cell lines. (G) CD1a antigen density in cell lines, primary coT-ALL samples, and primografts. (H) Cytotoxicity of CD1a CARTs and MOCK T cells against coT-ALL and B-ALL cell lines at the indicated E:T ratios in 16-hour assays (n = 4). (I) Absolute counts of alive eFluor-positive target cells measured according to FACS in 72-hour cytotoxicity assays at a 1:1 E:T ratio. (J) Representative FACS analysis of cytotoxicity with target cells labeled with eFluor 670 (shown in blue). (K) Enzyme-linked immunosorbent assay showing high-level production of the inflammatory cytokines IL-2, IFN- $\gamma$ , and TNF $\alpha$  by CD1a CARTs exposed to Jurkat and NALM6 (negative control) cells in 16-hour assays at a 1:1 E:T ratio (n = 4). n.s., not significant. \*P < .05, \*\*P < .01, \*\*\*P < .001.

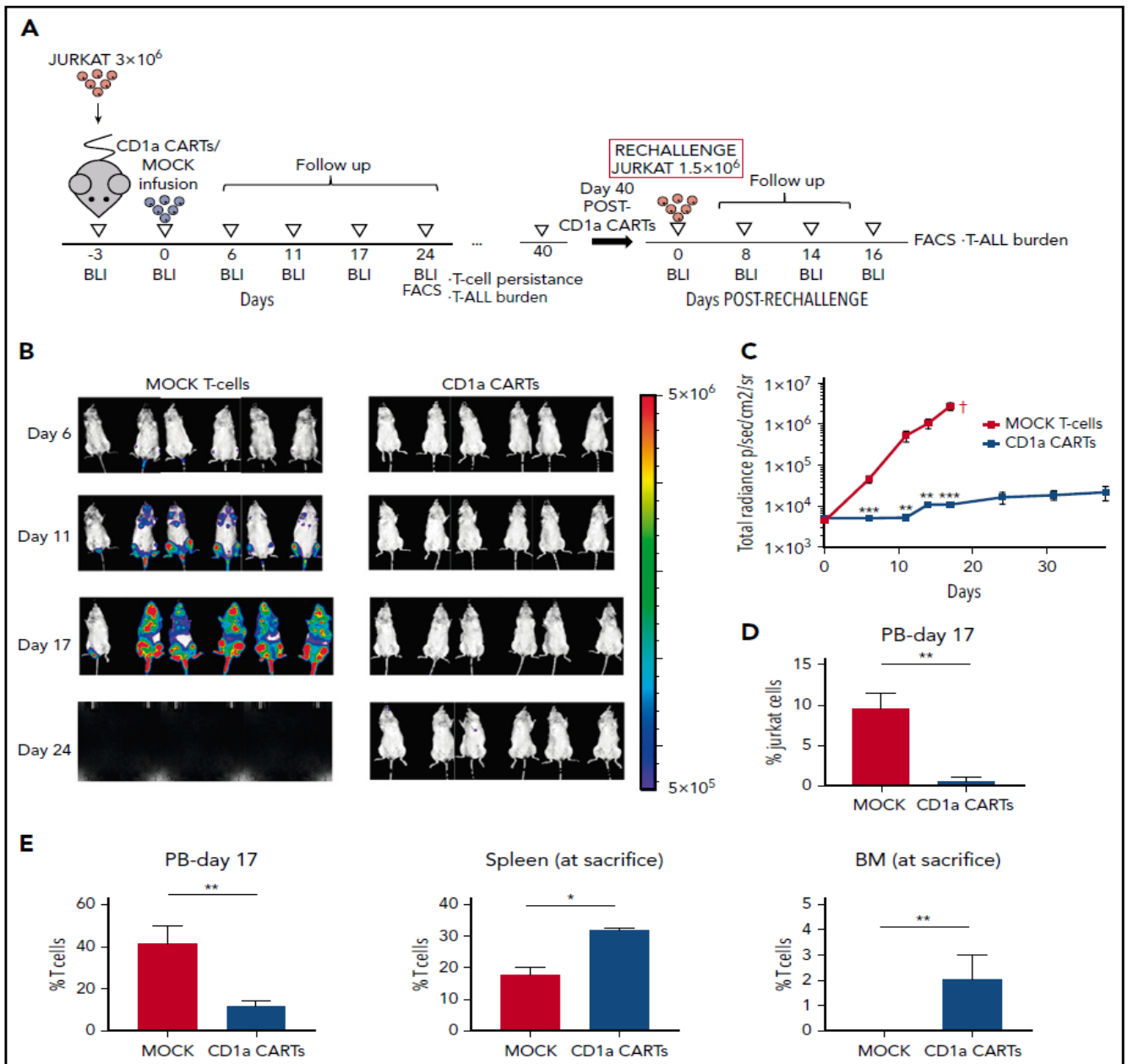


**Figure 3. CD1a CARTs specifically target and eliminate in vitro CD1a<sup>+</sup> T-ALL blasts from primary samples or PDX models.** (A) Expression of CD1a vs CD7 in coT-ALL blasts from primary patients/primografts. The percentage of CD1a<sup>+</sup> blasts is indicated. (B) Cytotoxicity (in absolute counts of eFluor-positive cells) measured by using FACS in 48-hour cytotoxicity assays at a 4:1 E:T ratio (n = 3). (C) Representative FACS analysis of CD1a (shown in blue) within the eFluor-labeled target cells at the end of the cytotoxicity assay, revealing specificity of CD1a CARTs (n = 3). (D) High-level production of pro-inflammatory cytokines by CD1a CARTs analyzed according to enzyme-linked immunosorbent assay (n = 3 independent supernatants) in 16-hour assays at a 4:1 E:T ratio. \*P < .05, \*\*P < .01, \*\*\*P < .001, \*\*\*\*P < .0001.

linked to CARTs<sup>60-62</sup> and/or the use of CD1a CARTs as a therapy bridge before curative allogeneic HSPC transplantation.

Beyond the hematopoietic system, CD1a expression in humans is restricted to LCs in the skin, which constitute a very rare subset of dendritic cells in the epidermis.<sup>63</sup> The immunological homeostasis of LCs is vital to avoid inflammatory skin diseases such

as dermatitis and psoriasis. The in vivo role of CD1a has long remained a challenge because CD1a is not expressed in mice. However, a recent seminal paper based on mice with transgenic expression of CD1a<sup>64</sup> showed that CD1a drives the pathogenesis of poison-induced dermatitis and psoriasis.<sup>63</sup> Importantly, the authors also showed that treatment with CD1a-blocking antibodies alleviated skin inflammation with no comorbidity or side effects. This

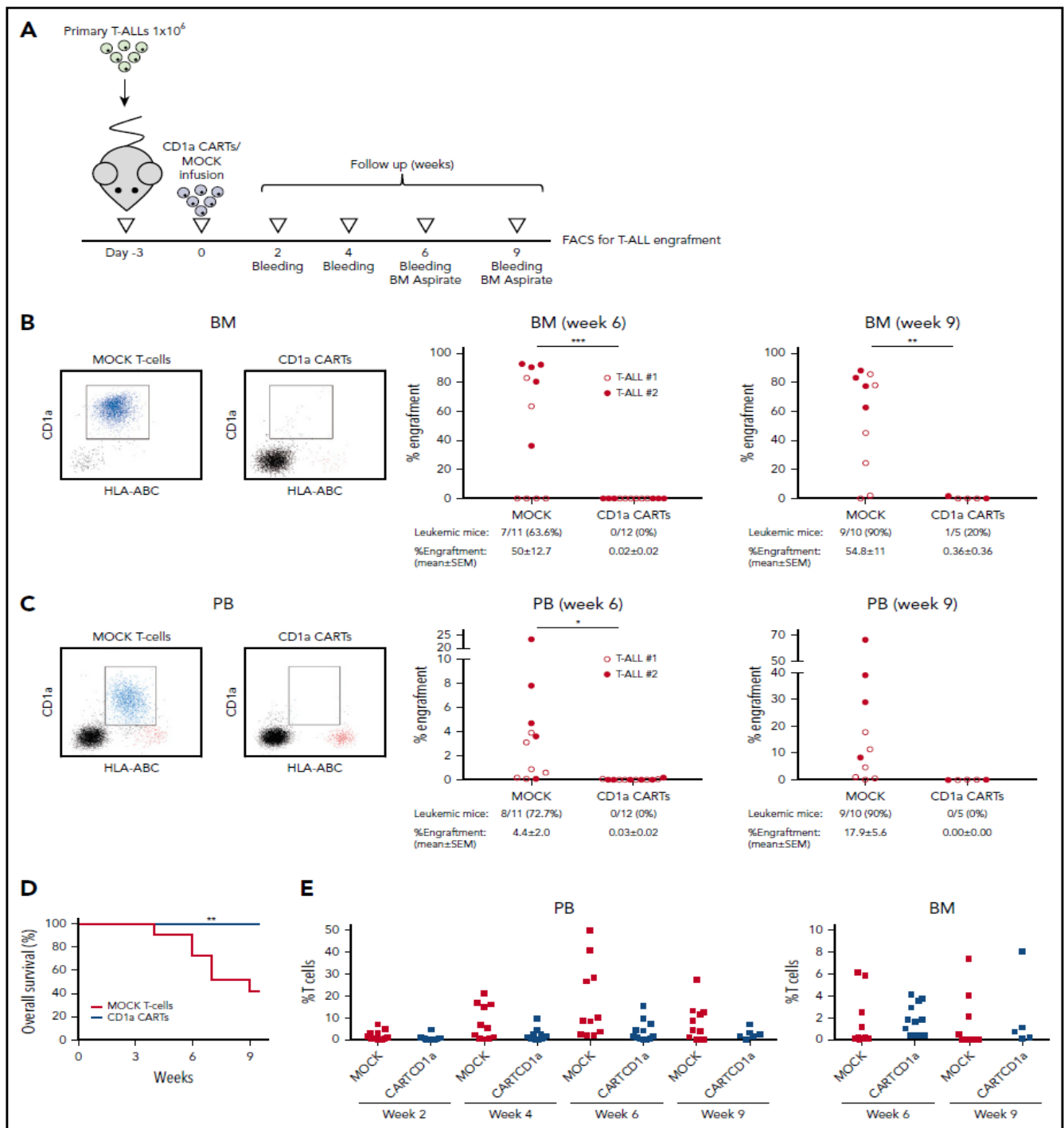


**Figure 4. CD1a CARTs fully control the progression of coT-ALL cells in a mouse xenograft setting.** (A) Scheme of the xenograft model. NSG mice ( $n = 6$ /group) were IV injected with  $3 \times 10^6$  Luc/GFP-expressing Jurkat cells followed 3 days after by a single IV injection of  $5 \times 10^6$  MOCK or CD1a CARTs. Tumor burden was monitored every 4 to 6 days according to BLI using IVIS imaging. When MOCK-treated animals were fully leukemic, one-half of the CD1a CART-treated animals were euthanized and analyzed by using FACS (BM, PB, and spleen) for leukemic burden and CART persistence. The remaining animals were rechallenged 6 weeks later with  $1.5 \times 10^6$  Luc-Jurkat cells and were followed up as before. (B) IVIS imaging of tumor burden monitored by BLI at the indicated time points. (C) Total radiance quantification at the indicated time points. †Euthanization. (D) Circulating Jurkat cells in PB 17 days after CARTs infusion. (E) T-cell persistence in PB at day 17, and spleen and BM at euthanization. Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$  mice/group). \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ .

finding highlights that CD1a is a potential therapeutic target in inflammatory skin diseases but also supports CD1a as a safe target for R/R coT-ALL. A phase 1 clinical trial is planned in our institution to confirm the safety of CD1a-directed CARTs in R/R coT-ALL. Unfortunately, CD1a-directed CAR is not a therapeutic choice for the aggressive ETP T-ALL, which is commonly CD1a<sup>-</sup>.

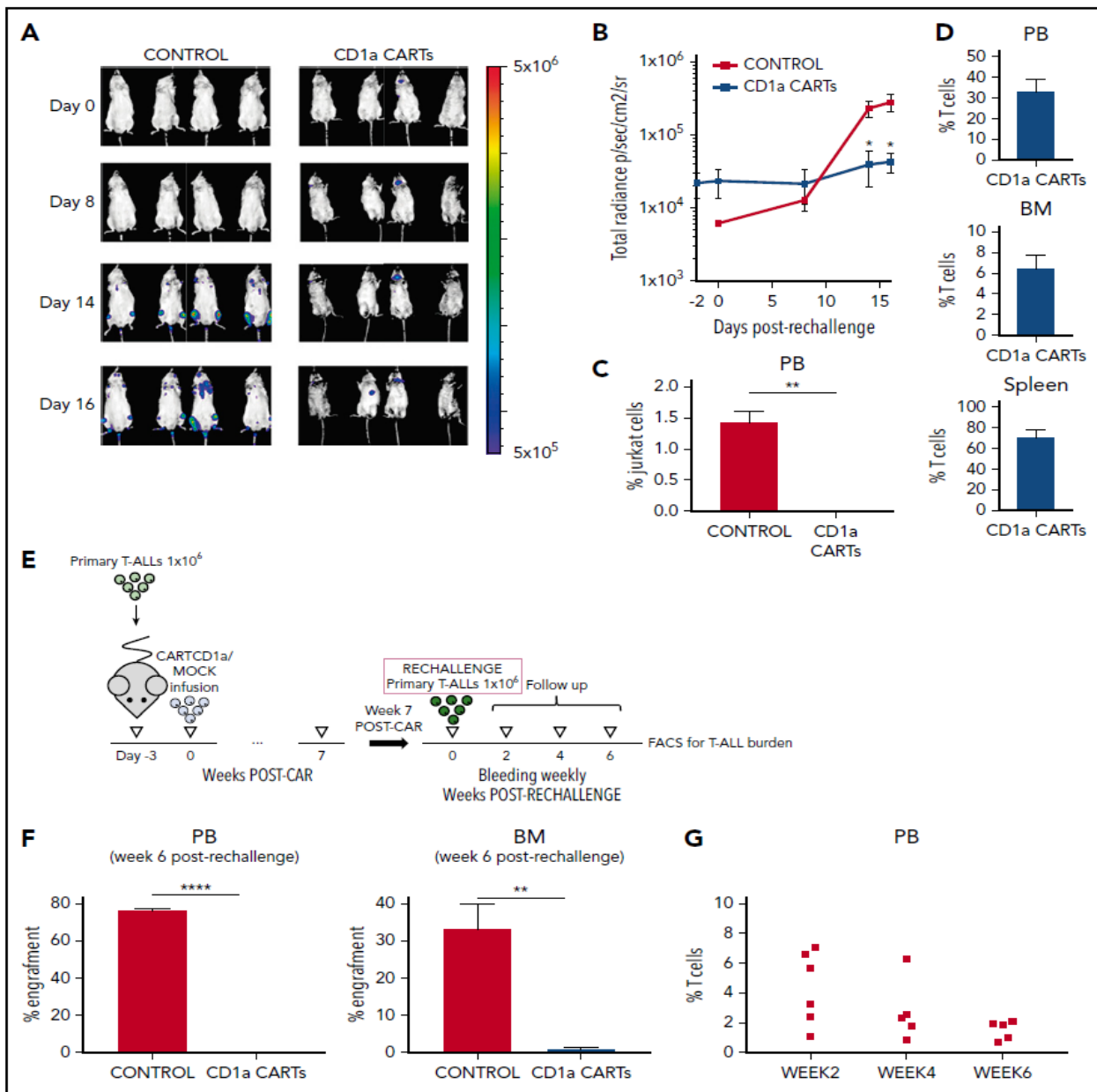
Last but not least, it remains to be determined whether autologous mature T cells can be recovered from the PB of patients with T-ALL, modified to express the CAR of interest, and retain cytolytic activity against the tumoral cells expressing the target antigen. Similarly, flow cytometric analysis of PB from patients with active T-ALL revealed the presence of mature CD3<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>T cells in all the patients. These PB-derived T cells were efficiently





**Figure 5. CD1a CARTs fully abolish the progression of primary CD1a<sup>+</sup> coT-ALL blasts in a PDX setting.** (A) Scheme of the PDX model. NSG mice (n = 5–6/group) were IV injected with  $1 \times 10^6$  primary coT-ALL cells followed 3 days after by a single IV injection of  $1 \times 10^6$  MOCK or CD1a CARTs. Tumor burden was monitored according to FACS every other week by bleeding and BM aspirate after 6 and 9 weeks. Frequency of leukemic mice and levels of leukemia in BM (B) and PB (C) 6 and 9 weeks after infusion of CARTs. The left panels show representative FACS plots. Primary CD1a<sup>+</sup> T-ALL blasts are shown in blue, effector T cells are shown in red, and mouse cells are shown in black. (D) Nine-week OS of coT-ALL primografts receiving either CD1a CARTs or MOCK T cells. (E) Effector T-cell persistence over time in PB (week 2 toward week 9) and BM (weeks 6 and 9). Each dot represents an independent mouse. \**P* < .05, \*\**P* < .01, \*\*\**P* < .001, Malcom-Cox test.

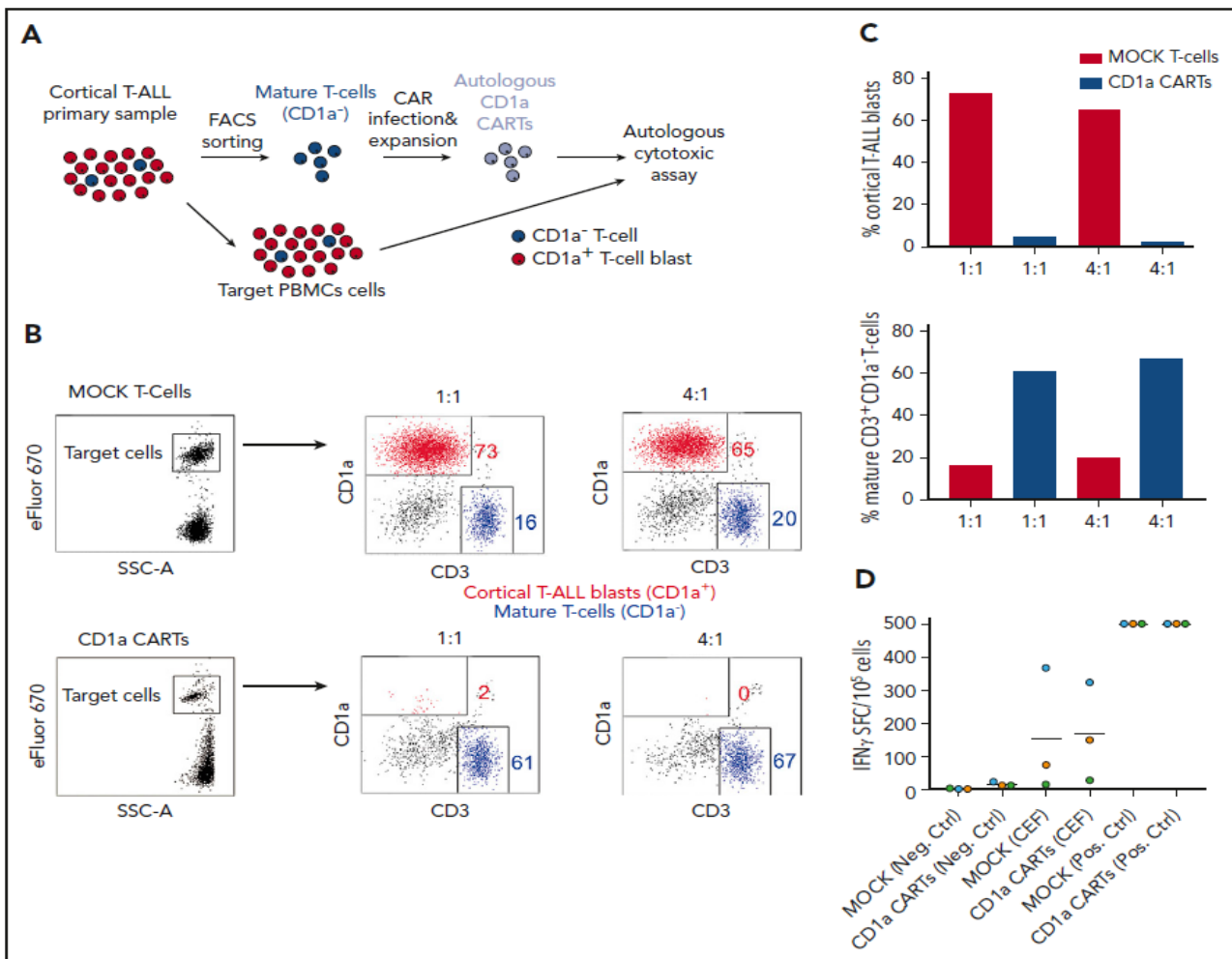




**Figure 6. CD1a CARTs retain the ability to control progression of CD1a<sup>+</sup> cell lines and coT-ALL primary samples in a rechallenge PDX setting.** (A) IVIS imaging of Jurkat cells burden in the rechallenge mice. (B) Total radiance quantification over time in the mice rechallenge with Jurkat cells. (C) Circulating Jurkat cells in PB 16 days after rechallenge. (D) Robust effector T-cell persistence in PB, BM, and spleen at euthanization of the rechallenge animals. (E) Scheme of the rechallenge PDX experiments using coT-ALL primary samples. CART-bearing PDX mice were rechallenge with  $1 \times 10^6$  primary CD1a<sup>+</sup> T-ALL 7 weeks after initial CART infusion. (F) Secondary coT-ALL burden in engrafted PB (left panel) and BM (right panel) 6 weeks after leukemia rechallenge. (G) Effector T-cell persistence over time in PB (weeks 2, 4, and 6) from PDXs rechallenge with coT-ALL primary samples. Each dot represents an independent mouse. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\*\* $P < .0001$ .

harvested from patients with coT-ALL, modified to express CD1aCAR. They exhibited a potent and specific cytolytic activity against autologous CD1a<sup>+</sup> T-ALL blasts, reinforcing the notion that CD1a CARTs are fratricide resistant. Furthermore, as a note of safety, the genome-wide mutational landscape of both pediatric and adult T-ALL<sup>65</sup> has revealed 106 somatic oncogenic drivers present in diagnostic samples but absent in remission mononuclear cells and T cells, suggesting that mature T cells

would be a relatively safe source of autologous T cells for CAR transduction. We propose CD1a CART immunotherapy once tumor burden has been extensively reduced with standard therapies. Alternatively, donor T cells would represent an ideal effector source in patients with coT-ALL who previously underwent allogeneic HSPC transplantation. Finally, universal, "off-the-shelf" allogeneic-suitable T cells are the short-term "holy grail" for leukemia immunotherapies because T-cell lymphopenia or T-cell



**Figure 7. CD1a CARTs derived from patients with coT-ALL at presentation (specifically lyse autologous CD1a<sup>+</sup> T-ALL blasts).** (A) Scheme depicting the experimental design for the autologous cytotoxic assay. Mature (normal) CD3<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> T cells were FACS-purified from the PB of a patient with coT-ALL, infected with CD1a CAR, expanded, and exposed to autologous total PBMCs. (B) FACS analysis of autologous cytotoxic 48-hour assay at 1:1 and 4:1 E:T ratios. eFluor 670-labeled total PBMC target population contains CD1a<sup>+</sup> T-ALL blasts (red) and mature CD3<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> T cells (blue). (C) Quantification of CD1a CART-mediated specific lysis for coT-ALL blasts (upper panel) and CD3<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> mature T cells (bottom panel). (D) ELISpot showing the number of IFN- $\gamma$  SFC from mock vs CD1a CARTs stimulated with a pool of peptides from CMV, EBV, and flu (CEF). Staphylococcal enterotoxin B was used as positive control. SFC, spot-forming cell.

dysfunction occurs in many multitreated R/R patients with hematological malignancies. As such, preliminary studies have already shown the potential of using universal allo-tolerant off-the-shelf CARTs generated by genomic editing-mediated deletion of receptors such as CD3, T-cell receptor, or  $\beta_2$ -microglobulin, which are essential for antigen recognition and immune function in a major histocompatibility complex-dependent context.<sup>15,19</sup> We provide preclinical evidence for the therapeutic and safe use of fratricide-resistant CD1a CARTs for R/R coT-ALL.

## Acknowledgments

The authors thank Josep Nomdedeu (Hospital Sant Pau, Barcelona) and Vicky Martínez (Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia) for providing diagnostic immunophenotyping data, Neus Villamor (Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain) and Jorge Rossi and Marisa Felice (Garrahan Pediatric Hospital, Buenos Aires, Argentina) for providing FACS and clinical

data, and Julio Castaño, Maria Castellá, and Paolo Petazzi (members of Pablo Menéndez laboratory) for fruitful technical discussions. They are also indebted to Maksim Mamonkin (Baylor College of Medicine, Houston, TX) for helping them with T-cell expansion.

This research was supported by the European Research Council (H2020) (CoG-2014-646903), the Agencia Estatal de Investigación/European Regional Development Fund (SAF2016-80481-R and SAF2016-75442-R), and the Catalunya Government (SGR330 and PERIS 2017) (P.M.), as well as the Asociación Española Contra el Cáncer, Beca FERRO, and the ISCIII/FEDER (PI17/01028) (C.B.). P.M. also acknowledges institutional support from the Obra Social La Caixa-Fundació Josep Carreras. J.G.P. holds a Miguel Servet contract (CP15/00014), and O.B.-L. is supported by an AGAUR-FI fellowship from the Catalan Government. P.M. is an investigator of the Spanish Cell Therapy cooperative network (TERCEL).

## Authorship

Contribution: D.S.-M. conceived the study, designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the paper; M.L.B., F.G.-A.,

H.R.-H., M.T., J.J., T.V.-H., O.B.-L., J.G.P., B.U., and J. Calvo performed experiments and analyzed data; M.C., J.L.F., M.R.-O., S.G.-G., F.P., J. Cools, and M.L.T. provided primary T-ALL samples, primografts, and FACS data; C.B. performed experiments and financially supported the study; and P.M. conceived the study, designed experiments, wrote the manuscript, and financially supported the study.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: S.G.-G., 0000-0002-0315-2136; M.R.-O., 0000-0003-0332-6973; T.V.-H., 0000-0003-2183-7443.

Correspondence: Pablo Menéndez, Josep Carreras Leukaemia Research Institute, School of Medicine, Barcelona University, Carrer Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain; e-mail: pmenendez@carrerasresearch.org; and Diego Sánchez-Martínez, Josep Carreras Leukaemia Research Institute,

School of Medicine, Barcelona University, Carrer Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain; e-mail: dsanchez@carrerasresearch.org.

## Footnotes

Submitted 29 October 2018; accepted 18 February 2019. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 22 February 2019; DOI 10.1182/blood-2018-10-882944.

The online version of this article contains a data supplement.

There is a *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

## REFERENCES

- Karman K, Johansson B. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017;56(2):89-116.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-271.
- Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med*. 2015;373(16):1541-1552.
- Litzow MR, Ferrando AA. How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*. 2015;126(7):833-841.
- Schneider NR, Carroll AJ, Shuster JJ, et al. New recurring cytogenetic abnormalities and association of blast cell karyotypes with prognosis in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group report of 343 cases. *Blood*. 2000;96(7):2543-2549.
- Ballerini P, Landman-Parker J, Cayuela JM, et al. Impact of genotype on survival of children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the French protocol FRALLE-93: the effect of TLX3/HOX11L2 gene expression on outcome. *Haematologica*. 2008;93(11):1658-1665.
- Karman K, Forestier E, Heyman M, et al; NOPHO Leukemia Cytogenetic Study Group (NLCSG). Clinical and cytogenetic features of a population-based consecutive series of 285 pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias: rare T-cell receptor gene rearrangements are associated with poor outcome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(9):795-805.
- Sutton R, Shaw PJ, Venn NC, et al. Persistent MRD before and after allogeneic BMT predicts relapse in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2015;168(3):395-404.
- Qasim W, Thrasher AJ. Progress and prospects for engineered T cell therapies. *Br J Haematol*. 2014;166(6):818-829.
- Humphries C. Adoptive cell therapy: Honing that killer instinct. *Nature*. 2013;504(7480):S13-S15.
- Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2013;5(177):177ra38.
- Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507-1517.
- Gardner RA, Finney O, Annesley C, et al. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood*. 2017;129(25):3322-3331.
- Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med*. 2018;24(1):20-28.
- Cooper ML, Choi J, Staser K, et al. An "off-the-shelf" fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia*. 2018;32(9):1970-1983.
- Gomes-Silva D, Srinivasan M, Sharma S, et al. CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies. *Blood*. 2017;130(3):285-296.
- Png YT, Vinanica N, Kamiya T, Shimasaki N, Coustan-Smith E, Campana D. Blockade of CD7 expression in T cells for effective chimeric antigen receptor targeting of T-cell malignancies. *Blood Adv*. 2017;1(25):2348-2360.
- Mamonkin M, Rouce RH, Tashiro H, Brenner MK. A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood*. 2015;126(8):983-992.
- Rasaiyaah J, Georgiadis C, Preece R, Mock U, Qasim W. TCR $\alpha\beta$ /CD3 disruption enables CD3-specific antileukemic T cell immunotherapy. *JCI Insight*. 2018;3(13):99442.
- Maciocia PM, Wawrzyniecka PA, Philip B, et al. Targeting the T cell receptor  $\beta$ -chain constant region for immunotherapy of T cell malignancies. *Nat Med*. 2017;23(12):1416-1423.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al; European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia*. 1995;9(10):1783-1786.
- Burger R, Hansen-Hagge TE, Drexler HG, Gramatzki M. Heterogeneity of T-acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell lines: suggestion for classification by immunophenotype and T-cell receptor studies. *Leuk Res*. 1999;23(1):19-27.
- Niehues T, Kapaun P, Harms DO, et al. A classification based on T cell selection-related phenotypes identifies a subgroup of childhood T-ALL with favorable outcome in the COALL studies. *Leukemia*. 1999;13(4):614-617.
- van Grotel M, Meijerink JP, van Wering ER, et al. Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences. *Leukemia*. 2008;22(1):124-131.
- Chancellor A, Gadola SD, Mansour S. The versatility of the CD1 lipid antigen presentation pathway. *Immunology*. 2018;154(2):196-203.
- Smiley ST, Lanthier PA, Couper KN, et al. Exacerbated susceptibility to infection-stimulated immunopathology in CD1d-deficient mice. *J Immunol*. 2005;174(12):7904-7911.
- Exley MA, Bigley NJ, Cheng O, et al. CD1d-reactive T-cell activation leads to amelioration of disease caused by diabetogenic encephalomyocarditis virus. *J Leukoc Biol*. 2001;69(5):713-718.
- Bechan GI, Lee DW, Zajonc DM, et al. Phage display generation of a novel human anti-CD1A monoclonal antibody with potent cytolytic activity. *Br J Haematol*. 2012;159(3):299-310.
- Carrera Silva EA, Nowak W, Tessone L, et al. CD207<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> cells circulate in pediatric patients with active Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2017;130(17):1898-1902.
- Prieto C, Stam RW, Agraz-Doblas A, et al. Activated KRAS cooperates with MLL-AF4 to promote extramedullary engraftment and migration of cord blood CD34<sup>+</sup> HSPC that is insufficient to initiate leukemia. *Cancer Res*. 2016;76(8):2478-2489.
- Muñoz-López Á, van Roon EH, Romero-Moya D, et al. Cellular ontogeny and hierarchy influence the reprogramming efficiency of human B cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2016;34(3):581-587.
- Muñoz-López A, Romero-Moya D, Prieto C, et al. Development refractoriness of MLL-rearranged human B cell acute leukemias to reprogramming into pluripotency. *Stem Cell Reports*. 2016;7(4):602-618.



33. Bueno C, Roldan M, Anguita E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells from patients with aplastic anemia maintain functional and immune properties and do not contribute to the pathogenesis of the disease. *Haematologica*. 2014;99(7):1168-1175.
34. Menendez P, Catalina P, Rodríguez R, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J Exp Med*. 2009;206(13):3131-3141.
35. Rodríguez R, Tomin J, Suarez C, et al. Expression of FUS-CHOP fusion protein in immortalized/transformed human mesenchymal stem cells drives mixoid liposarcoma formation. *Stem Cells*. 2013;31(10):2061-2072.
36. Lee L, Draper B, Chaplin N, et al. An APRIL-based chimeric antigen receptor for dual targeting of BCMA and TACI in multiple myeloma. *Blood*. 2018;131(7):746-758.
37. Recasens-Zorzo C, Cardesa-Salzmann T, Petazzi P, et al. Pharmacological modulation of CXCR4 cooperates with BET bromodomain inhibition in diffuse large B-cell lymphoma [published online ahead of print 28 June 2018]. *Haematologica*. doi:10.3324/haematol.2017.180505.
38. García-Peydró M, Fuentes P, Mosquera M, et al. The NOTCH1/CD44 axis drives pathogenesis in a T cell acute lymphoblastic leukemia model. *J Clin Invest*. 2018;128(7):2802-2818.
39. Dalmau J, Rotger M, Erkizia I, et al; CoRP Study Group. Highly pathogenic adapted HIV-1 strains limit host immunity and dictate rapid disease progression. *AIDS*. 2014;28(9):1261-1272.
40. Addo MM, Yu XG, Rathod A, et al. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol*. 2003;77(3):2081-2092.
41. Marks DI, Paietta EM, Mooman AV, et al. T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood*. 2009;114(25):5136-5145.
42. Jain N, Lamb AV, O'Brien S, et al. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (ETP-ALL/LBL) in adolescents and adults: a high-risk subtype. *Blood*. 2016;127(15):1863-1869.
43. Patel JL, Smith LM, Anderson J, et al. The immunophenotype of T-lymphoblastic lymphoma in children and adolescents: a children's oncology group report. *Br J Haematol*. 2012;159(4):454-461.
44. Martín-Gayo E, González-García S, García-León MJ, et al. Spatially restricted JAG1-Notch signaling in human thymus provides suitable DC developmental niches. *J Exp Med*. 2017;214(11):3361-3379.
45. Galy A, Verma S, Bárcena A, Spits H. Precursors of CD3+CD4+CD8+ cells in the human thymus are defined by expression of CD34. Delineation of early events in human thymic development. *J Exp Med*. 1993;178(2):391-401.
46. Lepretre S, Graux C, Touzart A, Macintyre E, Boissel N. Adult T-type lymphoblastic lymphoma: treatment advances and prognostic indicators. *Exp Hematol*. 2017;51:7-16.
47. Mendes RD, Canté-Barrett K, Pieters R, Meijerink JP. The relevance of PTEN-AKT in relation to NOTCH1-directed treatment strategies in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(9):1010-1017.
48. LeMaistre CF, Rosen S, Frankel A, et al. Phase I trial of H65-RTA immunoconjugate in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 1991;78(5):1173-1182.
49. Frankel AE, Laver JH, Willingham MC, Burns LJ, Kersey JH, Vallera DA. Therapy of patients with T-cell lymphomas and leukemias using an anti-CD7 monoclonal antibody-ricin A chain immunotoxin. *Leuk Lymphoma*. 1997;26(3-4):287-298.
50. Cernadas M, Lu J, Watts G, Brenner MB. CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(3):523-533.
51. Collin M, McGovern N, Haniifa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22-30.
52. Juncà J, Botín T, Vila J, Navarro JT, Millá F. Adult T-cell leukemia/lymphoma with an unusual CD1a positive phenotype. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014;86(4):292-296.
53. Haynes BF, Hale LP, Weinhold KJ, et al. Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest*. 1999;103(4):453-460.
54. Mancebo E, Clemente J, Sanchez J, et al. Longitudinal analysis of immune function in the first 3 years of life in thymectomized neonates during cardiac surgery. *Clin Exp Immunol*. 2008;154(3):375-383.
55. Eysteinsdóttir JH, Freysdóttir J, Haraldsson A, et al. The influence of partial or total thymectomy during open heart surgery in infants on the immune function later in life. *Clin Exp Immunol*. 2004;136(2):349-355.
56. Ramos SB, Garcia AB, Viana SR, Voltarelli JC, Falcão RP. Phenotypic and functional evaluation of natural killer cells in thymectomized children. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996;81(3):277-281.
57. van den Broek T, Madi A, Delemarre EM, et al. Human neonatal thymectomy induces altered B-cell responses and autoreactivity. *Eur J Immunol*. 2017;47(11):1970-1981.
58. Kurobe H, Tominaga T, Sugano M, et al. Complete but not partial thymectomy in early infancy reduces T-cell-mediated immune response: three-year tracing study after pediatric cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;145(3):656-662.e2; discussion 662.
59. van den Broek T, Delemarre EM, Janssen WJ, et al. Neonatal thymectomy reveals differentiation and plasticity within human naive T cells. *J Clin Invest*. 2016;126(3):1126-1136.
60. Diaconu I, Ballard B, Zhang M, et al. Inducible caspase-9 selectively modulates the toxicities of CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Mol Ther*. 2017;25(3):580-592.
61. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1673-1683.
62. Straathof KC, Pulè MA, Yotnda P, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*. 2005;105(11):4247-4254.
63. Kim JH, Hu Y, Yongqing T, et al. CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin disease. *Nat Immunol*. 2016;17(10):1159-1166.
64. Kobayashi C, Shiina T, Tokioka A, et al. GM-CSF-independent CD1a expression in epidermal Langerhans cells: evidence from human CD1A genome-transgenic mice. *J Invest Dermatol*. 2012;132(1):241-244.
65. Homminga I, Pieters R, Langerak AW, et al. Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2011;19(4):484-497.



## ORIGINAL ARTICLE

# *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant and *Tet2* inactivation cooperate in the deregulation of DNA methylation control to induce lymphoid malignancies in mice

L Scourzac<sup>1,2,3,4</sup>, L Couronné<sup>1,2,3,4</sup>, MT Pedersen<sup>5,6</sup>, V Della Valle<sup>1,2,3,4</sup>, M Diop<sup>1,2,3,4</sup>, E Mylonas<sup>1,2,3,4</sup>, J Calvo<sup>2,3,7,8</sup>, E Mouly<sup>1,2,4,3</sup>, CK Lopez<sup>1,3,4</sup>, N Martin<sup>9,10</sup>, M Fontenay<sup>11,12</sup>, A Bender<sup>13</sup>, S Guibert<sup>13</sup>, P Dubreuil<sup>14,15</sup>, P Dessen<sup>1,2,3,4</sup>, N Droin<sup>1,2,3,4</sup>, F Pflumio<sup>2,3,7,8</sup>, M Weber<sup>13</sup>, P Gaulard<sup>9,10,16</sup>, K Helin<sup>5,6,17</sup>, T Mercher<sup>1,3,4</sup> and OA Bernard<sup>1,2,3,4</sup>

*TEN-ELEVEN-TRANSLOCATION-2 (TET2)* and *DNA-METHYLTRANSFERASE-3A (DNMT3A)*, both encoding proteins involved in regulating DNA methylation, are mutated in hematological malignancies affecting both myeloid and lymphoid lineages. We previously reported an association of *TET2* and *DNMT3A* mutations in progenitors of patients with angioimmunoblastic T-cell lymphomas (AITL). Here, we report on the cooperative effect of *Tet2* inactivation and *DNMT3A* mutation affecting arginine 882 (*DNMT3A*<sup>R882H</sup>) using a murine bone marrow transplantation assay. Five out of eighteen primary recipients developed hematological malignancies with one mouse developing an AITL-like disease, two mice presenting acute myeloid leukemia (AML)-like and two others T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)-like diseases within 6 months following transplantation. Serial transplantations of *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> progenitors led to a differentiation bias toward the T-cell compartment, eventually leading to AITL-like disease in 9/12 serially transplanted recipients. Expression profiling suggested that *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> T-ALLs resemble those of *NOTCH1* mutant. Methylation analysis of *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> T-ALLs showed a global increase in DNA methylation affecting tumor suppressor genes and local hypomethylation affecting genes involved in the Notch pathway. Our data confirm the transformation potential of *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> progenitors and represent the first cooperative model in mice involving *Tet2* inactivation driving lymphoid malignancies.

Leukemia (2016) 30, 1388–1398; doi:10.1038/leu.2016.29

## INTRODUCTION

DNA methylation of CpG dinucleotides is one of the major epigenetic marks in mammals, and is known to have crucial roles in cellular processes including imprinting, gene expression regulation and control of differentiation. Mammalian enzymes catalyzing the conversion of cytosine to 5-methylcytosine (5-mC) by transferring a methyl group on the carbon 5 of cytosine belong to the DNA methyltransferase (DNMT) family including DNMT1, DNMT3A, DNMT3B and DNMT3L. Somatic heterozygous mutations in the *DNMT3A* gene have been reported in myeloid<sup>1,2</sup> and lymphoid malignancies,<sup>3</sup> and frequently target Arg882 (R882). The functional consequences of this mutant have been analyzed in murine embryonic stem cells, in which *Dnmt3a*<sup>R878H</sup> inhibits wild-type (WT) *Dnmt3a* and *Dnmt3b*.<sup>4</sup> In human, the *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutated protein presents as well a dominant-negative activity against *DNMT3A*<sup>WT</sup> by preventing the active homotetramer formation.<sup>5</sup> *Dnmt3a*-null mice present a hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) expansion and differentiation bias toward B-cell compartment upon serial transplantations, those B lymphocytes retaining high expression of hematopoietic stem cell-associated genes.<sup>6</sup>

Ten-Eleven-Translocation (TET) 2 catalyzes the conversion of 5-mC to 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) and may lead to active DNA demethylation. Loss-of-function mutations affecting *TET2* gene have been described in human hematological malignancies affecting both myeloid and lymphoid lineages.<sup>7–9</sup> Studies in *Tet2*-inactivated mice revealed a cell-autonomous competitive advantage of hematopoietic progenitors followed by chronic myelomonocytic leukemia in a fraction of the animals.<sup>10</sup> This late malignant development in *Tet2*-inactivated context suggests that cooperative mutations are necessary for full-blown malignancy. Recently, such cooperations have been experimentally demonstrated in myeloid transformations in mice.<sup>11–17</sup>

We previously reported a significant co-occurrence of *TET2* and *DNMT3A* mutations in peripheral T-cell lymphoma patients; particularly frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL).<sup>3,18,19</sup> *TET2*-mutated peripheral T-cell lymphoma shows a follicular helper T-cell (T<sub>fh</sub>) signature and correlates with adverse outcome in patients.<sup>20</sup>

Here, we explore the functional consequences of *TET2* and *DNMT3A* mutations cooperation in hematopoiesis using a bone marrow transplantation (BMT) assay, in which mutant

<sup>1</sup>INSERM U1170, Villejuif, France; <sup>2</sup>Equipe labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France; <sup>3</sup>Université Paris-Sud, Orsay, France; <sup>4</sup>Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>5</sup>Biotech Research and Innovation Centre (BRIC), Copenhagen, Denmark; <sup>6</sup>Centre for Epigenetics, Copenhagen, Denmark; <sup>7</sup>INSERM U967, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>8</sup>CEA, DSV-IRCM-SCSR-LSHL, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>9</sup>INSERM U955, Créteil, France; <sup>10</sup>Université Paris-Est, Créteil, France; <sup>11</sup>Département d'Immuno-Hématologie, Hôpital Cochin, Paris, France; <sup>12</sup>INSERM U1016, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 8104, Institut Cochin, Paris, France; <sup>13</sup>CNRS, Université de Strasbourg, UMR7242, Illkirch, France; <sup>14</sup>INSERM U1068, CRCM, CNRS, Université Aix-Marseille, Marseille, France; <sup>15</sup>Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France; <sup>16</sup>Département de Pathologie, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France and <sup>17</sup>The Danish Stem Cell Center, Copenhagen, Denmark. Correspondence: Dr O Bernard, INSERM U1170, Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, Villejuif 94805, France.

E-mail: olivier.bernard@inserm.fr

Received 14 September 2015; revised 7 January 2016; accepted 18 January 2016; accepted article preview online 15 February 2016; advance online publication, 11 March 2016



*DNMT3A*<sup>R882H</sup> is expressed in *Tet2*-inactivated (*Tet2*<sup>-/-</sup>) HSPC. *Tet2* inactivation and *DNMT3A*<sup>R882H</sup> expression induced T-ALL or acute myeloid leukemia (AML) 6 months after transplantation. T-ALL is associated with hypermethylation and downregulation of tumor suppressor genes and hypomethylation and upregulation of *Notch1* oncogene. The majority of serially transplanted mice developed an AITL-like disease closely resembling the human disease. Our data constitute the first cooperative murine model of T-cell malignancies involving *Tet2* inactivation.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasmid construction

Full-length human *DNMT3A*<sup>R882H</sup>, *NOTCH1*<sup>L1601PΔP</sup> and *TCL1A* cDNA were subcloned into MSCV-GFP backbone. Retroviral preparations and transduction were performed as previously published.<sup>21</sup>

### Murine BMT

BMT using 3-month-old C57BL/6 WT and *Tet2*<sup>-/-</sup> donors was performed as described previously<sup>8</sup> leading to MSCV *Tet2*<sup>+/+</sup>, *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup>, MSCV *Tet2*<sup>-/-</sup> (*n* = 20) and *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> (*n* = 18) mice. For serial transplantation, HSPCs were flow sorted from whole marrow 16 weeks after transplantation, using GFP<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> Kit<sup>+</sup> gating and engrafted with supplemented 2.5 × 10<sup>5</sup> total marrow in lethally irradiated recipients (*n* = 10). Animal experiments were approved by the Gustave Roussy animal care and use committees, according to ARRIVE guidelines.

### Cell culture and western blotting

Culture of MO467, R152 and R338 cell lines, western blotting protocols and antibodies are described in Supplementary Methods.

### Cell purification and cytometry

Total white blood cells from hematopoietic organs were stained in PBS supplemented with 2% FBS with fluorochrome-conjugated mouse antibodies against specific hematopoietic lineage markers. For the analysis of transplant-receiving mice, whole bone marrow was stained with fluorochrome-conjugated mouse antibodies to discriminate cells derived from competitors and donors (CD45.1<sup>+</sup> and CD45.2<sup>+</sup>, respectively), and GFP expression was used to precisely define donor-derived cells (GFP<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup>). Fluorochrome-conjugated mouse antibodies were obtained from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France) (Streptavidin/PeCy5, CD117/PeCy7, CD45.1/PE, CD4/PE or PB, CD8/PeCy7 or APC, CD19/APC, B220/APCCy7, TCR $\beta$ /PE, CD279/BV421, CD11b/PerCP-Cy5.5, Annexin V/APC, Ki67/PE) and eBiosciences (Paris, France) (CD117/APCCy7, Sca-1/APC, CD45.2/APC, Gr1/PE). Hoechst 33342 was obtained from Invitrogen (Villebon sur Yvette, France). APC BrdU Flow kit (Becton Dickinson) was used according to the manufacturer's instruction. Cell sorting was performed either on a MoFlow (Beckman Coulter, Villepinte, France) or on a Influx (Becton Dickinson) cell sorter; and analysis on a Canto II (Becton Dickinson). FACS data were analyzed by the FlowJo Software (v8.8.7, FlowJo, Ashland, OR, USA).

### Methylation and hydroxymethylation analyses by MeDIP and hMeDIP sequencing

5-mC and 5-hmC DNA immunoprecipitations of genomic DNA were performed as described.<sup>22</sup> In all, 200–500 bp genomic DNA fragments were obtained using the bioruptor (Diagenode, Liège, Belgium); and adaptor ligation was performed with the NEBNext DNA sample Prep Master Mix (New England Biolabs, Evry, France). One microgram of adaptor ligated DNA was heat denatured and incubated with an IgG control antibody or with polyclonal 5-hmC<sup>22</sup> or monoclonal 5-mC (Eurogentec, Angers, France) antibody. Dynabeads (Invitrogen) were added before immunoprecipitation; and elution of DNA was obtained with proteinase K digestion. PCR amplification of immunoprecipitated DNA was performed using index Illumina (Paris, France) multiplex primers and single-end sequenced on HiSeq-2000. Reads were aligned to mouse genome mm10 with BWA aln (v0.7.3a) and peak calling assessed with the R package MEDIPS (v1.10.0; Matthias Lienhard and Lukas Chavez, La Jolla, CA, USA). Differential analysis of (hydroxy)methylation was done with edgeR and annotation with HOMER (v4.7.2; Sven Heinz and Christopher Benner, La Jolla, CA, USA). Differentially (hydroxy)methylated regions with a *P*-value of < 0.001 and

an FC value of > 1.5 were considered as significant. HOMER was also used for transcription factor binding motif discovery.

### Reduced representation bisulfite sequencing

Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) libraries were prepared as described previously<sup>23</sup> with minor modifications. Genomic DNA (50–200ng) was digested for 5 h with MspI, end-repaired, A tailed and ligated with T4 DNA ligase (Fementas, Villebon Sur Yvette, France) to methylated Illumina adaptors. In all, 150–400 bp fragments were gel-purified, bisulfite treated (EpiTect Bisulfite kit, Qiagen, Courtaboeuf, France); and RRBS libraries were amplified by 15 cycles of PCR with PfuTurbo Cx hotstar DNA polymerase (Agilent, Les Ulis, France) and indexed PE Illumina primers. The libraries were paired-end sequenced (2 × 75bp) on a HiSeq-2000 to an average of 30 million pairs of reads per sample. Raw reads were cleaned with Trim Galore (v0.2.1) and aligned to the mm10 genome with BSMAP (v2.74). We identified differentially methylated region (DMRs) with the eDMR algorithm from the methylKit R package with the following criteria: at least three CpGs, a difference in methylation greater than 20% and an adjusted *P*-value of < 0.01. DMRs were annotated using the RefSeq mm10 transcript annotation.

### RNAseq

RNA was extracted with the AllPrep kit (Qiagen), quantified as above and checked with Bioanalyzer (Agilent). SureSelect Automated Strand-Specific RNA Library Preparation Kit (Agilent) was used according to the manufacturer's instructions. Expression analysis was performed by counting the number of reads per gene using HTSeq-count; and differential expression was assessed using the R package DESeq. *P*-values < 0.05 and  $-2 < FC < 2$  were used as thresholds for differentially expressed genes.

### ChIPseq

ChIP analyses were performed according to the MagnaChIP kit (Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France). Briefly, 10 × 10<sup>6</sup> MO467 or R152 cells were prepared as previously published<sup>24</sup> with normal rabbit IgG (Millipore), H3K4me3 (Diagenode) and H3K27me3 (Millipore) antibodies. Adaptor-ligated libraries were prepared from 10ng of immunoprecipitated DNA using SPRIworks (Beckman Coulter). After indexed PCR amplification, the libraries were pooled and subjected to single-end sequencing. Reads were aligned to mouse genome mm10 with BWA aln (v0.7.5a) and peak calling assessed using MACS2 (v2.0.10.20131216) with a *q*-value cutoff of < 0.05. Annotation has been done with HOMER (v4.7.2).

### Data access

(h)MeDIP, RRBS, RNAseq and ChIPseq data have been deposited at ArrayExpress under accession numbers E-MTAB-4157 to E-MTAB-4161.

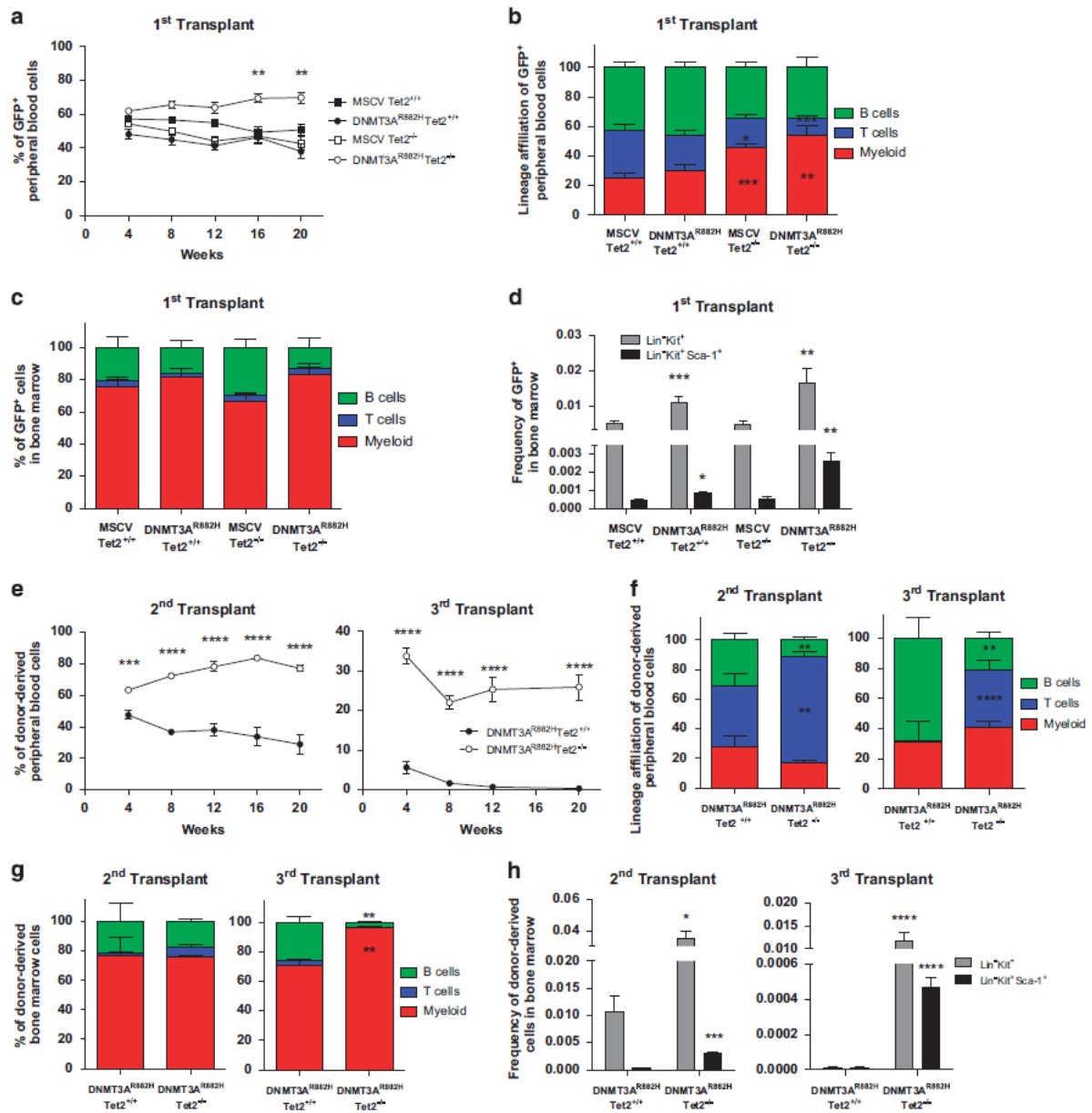
### Statistics

Data are depicted as mean ± s.e.m. as precised. *P*-values were calculated with the two-tailed unpaired Student's *t*-test. *P*-values for survival curves were calculated using a Log-rank (Mantel-Cox) test. All statistical analyses were performed with Prism software version 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). The size of animal cohorts was based on our previous studies as well as the published literature. Neither randomization nor blinding was used, since all animal experiments were performed with homogeneous strain, age and similar variance.

## RESULTS

Impairment of *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> HSPCs differentiation *in vivo*  
We performed BMT assays using *Tet2* wild-type (*Tet2*<sup>+/+</sup>) or *Tet2*<sup>-/-</sup> murine HSPC, transduced with *DNMT3A*<sup>R882H</sup>-expressing retroviruses. Monthly sampling of recipient mice revealed a mild growth advantage for *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> cells over non-transduced *Tet2*<sup>-/-</sup> cells, as shown by the constant increase of GFP<sup>+</sup> cells in recipients. In contrast, empty vector or *DNMT3A*<sup>R882H</sup> expression alone did not confer growth advantage over untransduced cells in a *Tet2*<sup>+/+</sup> context (Figure 1a). Engrafted cells showed efficient contribution to mature T, B and myeloid cells (Figure 1b) although myeloid cells expanded in *Tet2*<sup>-/-</sup>, as compared with





**Figure 1.** Proliferative advantage and impaired differentiation potential of *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> HSPC. Contribution of 1<sup>ary</sup> control (*MSCV Tet2*<sup>+/+</sup>), *DNMT3A*-mutated (*DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup>), *Tet2*-inactivated (*MSCV Tet2*<sup>-/-</sup>) and *Tet2*-inactivated and *DNMT3A*-mutated and *Tet2*-inactivated (*DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup>) GFP<sup>+</sup> HSPC in first transplant to: (a) blood cells showing significant enrichment for GFP<sup>+</sup> *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> after 16 weeks ( $n = 8-20$  mice per group); (b) mature blood lineages at 20 weeks post transplantation ( $n = 10$  per group) and (c) lineages at 20 weeks post transplantation in bone marrow of 1<sup>ary</sup> transplanted mice ( $n = 3$  per group). Percentages of GFP<sup>+</sup> myeloid cells (Mac1<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup>), B cells (CD19<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>) and T cells (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) are shown. (d) Frequencies of GFP<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup> and Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> progenitors in 1<sup>ary</sup> recipient mice ( $n = 3$  per group). (e) Contribution of donor-derived GFP<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup> HSPC to blood cells in 2<sup>ary</sup> ( $n = 9$ ) and 3<sup>ary</sup> ( $n = 10$ ) transplanted mice after 16 weeks. (f) Lineages contribution of GFP<sup>+</sup> HSPC at 20 weeks post transplantation in blood in 2<sup>ary</sup> and 3<sup>ary</sup> transplanted mice ( $n = 7$ ). (g) Lineage contribution of GFP<sup>+</sup> HSPCs at 20 weeks post transplantation in bone marrow in 2<sup>ary</sup> and 3<sup>ary</sup> transplanted mice ( $n = 3$ ). (h) Frequencies of GFP<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup> and Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> progenitors in 2<sup>ary</sup> and 3<sup>ary</sup> transplanted mice ( $n = 3$ ). Mean  $\pm$  s.e.m. values are shown in graphs. An unpaired Student's *t*-test was used for statistical analyses. Significant differences in comparison with *MSCV Tet2*<sup>+/+</sup> (b-d) and *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup> (e-h) are indicated with \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

*Tet2*<sup>+/+</sup> context. Contribution to the T-cell lineage was slightly decreased when *DNMT3A*<sup>R882H</sup> was expressed as compared with *MSCV* in the *Tet2*<sup>-/-</sup> context. The analysis of marrow and thymus of three mice per group 4 months after transplantation did not reveal significant difference in lineages proportions (Figure 1c) nor in thymic population repartition (Supplementary Figure S1A).

However, an increased proportion of Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup> (LK) and Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>Kit<sup>+</sup> (LSK) cells was observed when *DNMT3A*<sup>R882H</sup> is expressed (Figure 1d), in keeping with previous reports showing increased contribution of *Dnmt3a*-inactivated cells to the stem/progenitor fraction.<sup>6</sup>

Since *Dnmt3a* inactivation has been shown to impair HSPC differentiation upon serial transplantation,<sup>6</sup> we sorted GFP<sup>+</sup> LK

progenitors of three DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> or Tet2<sup>+/+</sup> mice 16 weeks post transplantation and serially transplanted them into ten secondary mice. GFP<sup>+</sup> LK progenitors from three secondary mice were engrafted in 10 tertiary recipients. DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> cells showed efficient participation to mature blood cells in both secondary and tertiary experiments, indicating their self-renewal capacity, whereas DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>+/+</sup> progenitors were progressively diluted (Figure 1e). Detailed analyses showed that the contribution of the donor-derived cells to mature lineages differs between Tet2 contexts in both secondary and tertiary transplantations (Figure 1f). Expression of DNMT3A<sup>R882H</sup> in Tet2<sup>+/+</sup> context induced an increase in the B-cell fraction, in keeping with the reported B-cell bias of Dnmt3a-inactivated HSPCs.<sup>5</sup> Expression of DNMT3A<sup>R882H</sup> in Tet2<sup>-/-</sup> progenitors led to an expansion of the T-cell compartment in blood in both secondary and tertiary transplantations. However, DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> marrow examination did not show significant differences in lineage contribution in secondary transplant (Figure 1g, left) while 3<sup>ary</sup> transplants showed an accumulation of mature myeloid cells in marrow as compared with DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>+/+</sup> mice (Figure 1g, right). As expected for Tet2<sup>-/-</sup> cells, the proportion of DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> HSPC in the bone marrow was significantly higher, compared with DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>+/+</sup> HSPC in secondary and tertiary transplanted recipients (Figure 1h). No difference in thymic populations repartition between DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> and DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>+/+</sup> secondary recipients was observed (Supplementary Figure S1B). Overall, these results indicate cooperation of the DNMT3A<sup>R882H</sup> mutant with Tet2 inactivation leading to differential accumulation of DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> cells in hematopoietic organs, with myeloid cells primarily in the marrow and T cells in the blood.

**AITL-like development in DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> serially transplanted engrafted mice**

During the course of the monitoring (10–16 months after transplantation), we killed four (out of six secondary) and five (out of six tertiary) DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> mice, based on peripheral cytopenia and splenomegaly (Table 1). Analyses identified enlarged thymus, along with an expansion of the CD4<sup>+</sup> T-cell population in the thymus (Figure 2a, left) and in all

hematopoietic organs investigated (data not shown). Since human AITL is associated with high PD1 expression levels, we investigated its expression in DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> T-cell populations. Cell surface expression of PD1 was observed on GFP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells in every tissue, including lymph nodes (Figure 2a, right). Histopathological analysis of DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> symptomatic mice showed an infiltration of both the splenic white pulp and the liver by pleomorphic predominantly small to medium lymphoid cells accompanied by eosinophils, plasma cells and a few scattered larger cells resulting in alteration of the normal liver architecture with some focused perivascular infiltrations (Figure 2b). The proliferation was essentially composed of CD3<sup>+</sup> and PD1<sup>+</sup> atypical T cells, whereas CD79a staining highlighted recruitment of a few large B lymphocytes in addition to the plasmocytes around T-cell infiltrates, therefore mimicking the pathological and phenotypic features of human AITL. The AITL phenotype was further underscored by the high expression of Bcl6, Pdc1, Cxcr5 and Icos genes,<sup>25,26</sup> in GFP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> cells as compared with normal Tet2<sup>+/+</sup> CD4<sup>+</sup> thymocytes (Figure 2c).

Together, these data showed that 75% (9/12) of mice serially engrafted with DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> progenitors developed an AITL-like disease.

**Mice transplanted with DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> HSPC die prematurely and develop acute leukemias**

We monitored disease development in primary recipients for 1 year. Tet2<sup>+/+</sup>, Tet2<sup>-/-</sup> and DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>+/+</sup> transplanted mice remained healthy throughout the period, whereas among the 18 DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> primary engrafted mice, 1 showed symptoms of AITL-like disease, 4 developed AML-like or T-ALL-like diseases, and the mice were killed around 6 months post engraftment (Figure 3a and Table 1).

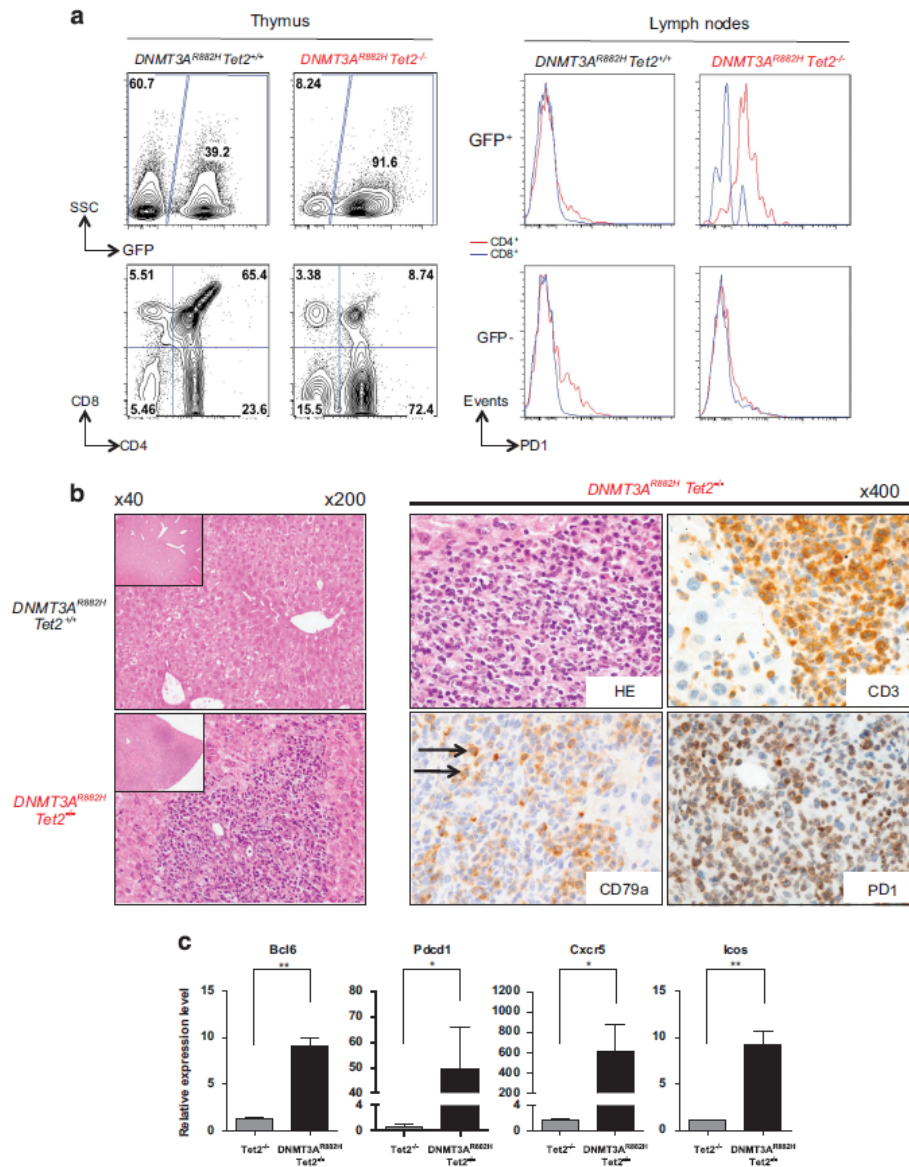
The two AML-like DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> mice exhibited hepatosplenomegaly and additional adenopathy (Table 1) consistent with 80% of Mac1<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> Kit<sup>+</sup> blastic myeloid population in the marrow (Figure 3b, left). Secondary transplantation experiments performed with one of the AML sample also confirmed the malignant nature of the tumor (data not shown). Bone marrow from T-ALL-like DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> recipients exhibited more

**Table 1.** Characteristics of symptomatic (AITL) and moribund (T-ALL and AML) mice

Frequency	Round of transplantation	Survival (days)	WBC (Kcells/μl)	HB (g/dl)	RBC (Kcells/μl)	PLT (Kcells/μl)	GFP <sup>+</sup> tumoral population	Disease	Autopsy
5/18	1 <sup>ary</sup>	179	12,73	10,9	6,95	155	Mac1 <sup>+</sup> Gr1 <sup>+</sup> Kit <sup>+</sup>	AML	Hepatosplenomegaly adenopathy
		180	8,15	13	8,77	723	Mac1 <sup>+</sup> Gr1 <sup>+</sup> Kit <sup>+</sup>	AML	Hepatosplenomegaly adenopathy
		181	8,21	12,6	9,21	689	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	T-ALL	Thymoma
		215	1,47	15	10,08	547	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	T-ALL	Mediastinal tumor
		363	4,08	14,9	6,64	456	CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	AITL	Hepatosplenomegaly adenopathy
4/6	2 <sup>ary</sup>	302	5,45	14,2	5,91	497	CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	AITL	Splenomegaly adenopathy
		302	3,49	14,5	7,96	449	CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	AITL	Splenomegaly adenopathy
		462	10,55	2,8	1,57	52	CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	AITL	Splenomegaly adenopathy
		497	3,42	10,2	5,12	204	CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	AITL	Splenomegaly adenopathy
5/6	3 <sup>ary</sup>	416	5,21	9,8	4,99	152	CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	AITL	Splenomegaly adenopathy
		461	3	11,4	5,28	253	CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	AITL	Splenomegaly adenopathy
		491	5,95	11,7	5,72	855	CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	AITL	-
		491	1,93	12,8	6,41	866	CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	AITL	Enlarged thymus
		491	4,27	13,3	6,25	793	CD4 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	AITL	-

Abbreviations: AITL, angioimmunoblastic T-cell lymphomas; AML, acute myeloid leukemia; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia. Survival indicates the number of survival days referring to subsequent transplant. Hemoglobin (HB) levels, white blood cell (WBC), red blood cell (RBC) and platelet (PLT) counts are indicated. Infiltration of tissues by GFP<sup>+</sup> lymphoid CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, myeloid Mac1<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> Kit<sup>+</sup> tumoral of GFP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> populations was determined by flow cytometry.



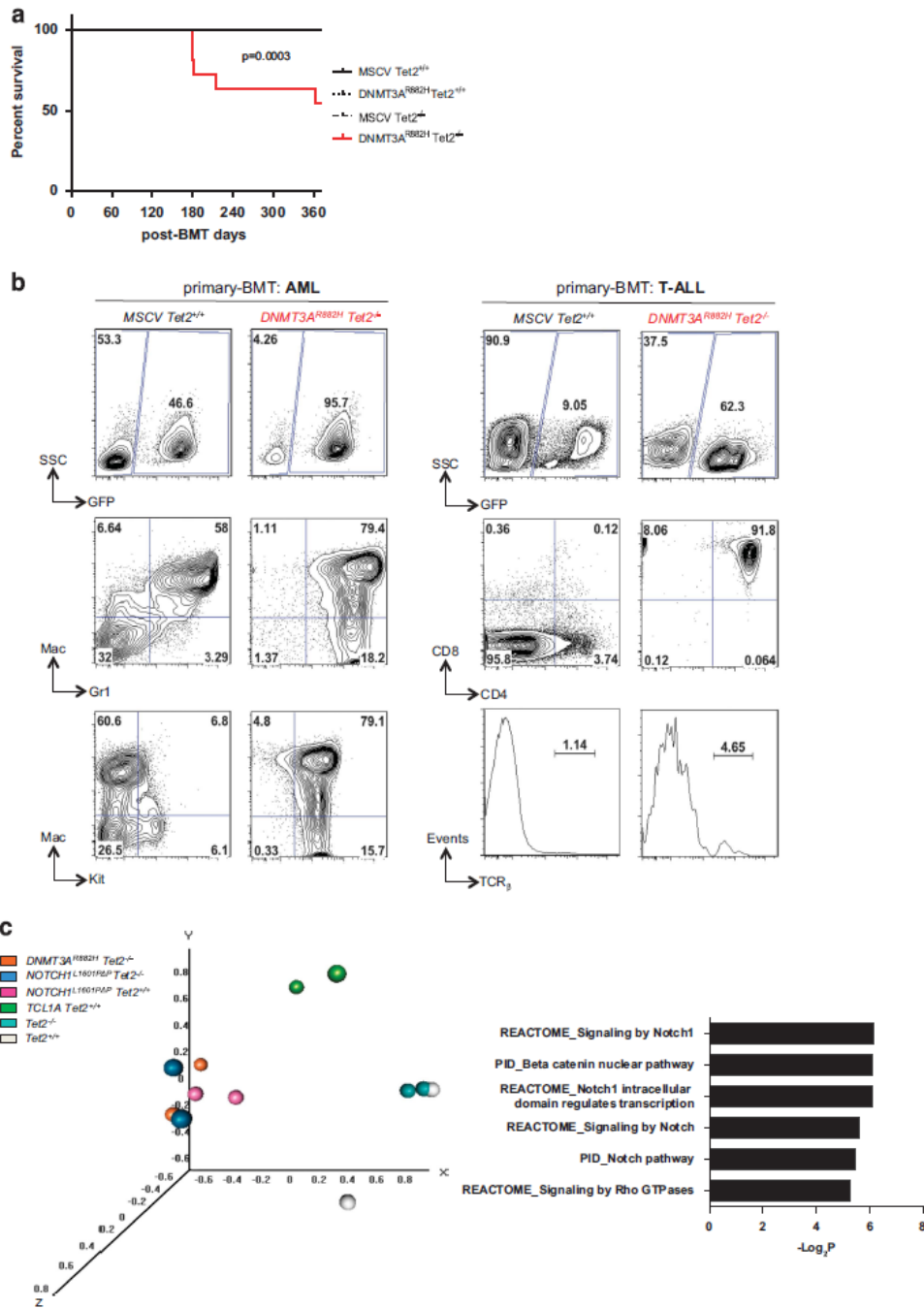


**Figure 2.** Development of AITL-like disease in mice serially transplanted with DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> HSPC. **(a)** Flow-cytometry analysis of the thymic and nodal cells from 2<sup>ary</sup> recipient mice. Frequencies of donor-derived GFP<sup>+</sup> cells are represented (top, left). CD4<sup>+</sup> population is expanded in the GFP<sup>+</sup> fraction of DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> in comparison with DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>+/+</sup> cells (bottom, left). Analysis of nodal cells of 2<sup>ary</sup> recipient mice shows surface expression of PD1 in DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> GFP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (red) but not in CD8<sup>+</sup> (blue) cells (top, right). GFP<sup>+</sup> cells are shown as controls (bottom, right). **(b)** Hematoxylin-Eosin staining of liver sections from a 10-month symptomatic DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> (bottom, left) animal and a DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>+/+</sup> (top, left) control (original magnification ×200). Insets show a smaller magnification of the same section and highlight the disorganized liver structure (original magnification ×40). Pathological analysis of liver section from a symptomatic DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> mouse with Hematoxylin-Eosin (top, middle) showing a dense atypical lymphoid infiltrate, containing a prominent CD3<sup>+</sup> T-cell population (top, right) expressing PD1 (bottom, right) admixed with scattered CD79a<sup>+</sup> B cells and plasmacytes (bottom, middle) (original magnification ×400). Arrows point at scattered large B cells recruited around T cells. **(c)** qRT-PCR validation of *Bcl6*, *Pcdcl1*, *Cxcr5* and *Icos* genes overexpression in GFP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> of AITL mice (n=2) as compared with CD4<sup>+</sup> Tet2<sup>-/-</sup> thymocytes (n=3). Each value represents the mean ± s.e.m. An unpaired Student's t-test was used for statistical analyses. Significant differences between groups are indicated. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.

than 90% of abnormal GFP<sup>+</sup> TCR $\beta$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (double positive, DP) T cells (Figure 3b, right), which induced a similar T-ALL to transplanted recipients (Supplementary Figure S2A). Histopathological analysis showed alteration in the normal liver architecture with significant diffuse T-cell infiltration accompanied with focused perivascular infiltrations (Supplementary Figure S2B). These findings show that DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> progenitors are predisposed to both myeloid and lymphoid acute transformation *in vivo*.

Concomitant ablation of *Tet2* and overexpression of DNMT3A<sup>R882H</sup> induce both global and local changes of 5-hmC and 5-mC epigenomic patterns

As the amount of material available from AITL-like mice was not sufficient, we then used DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> T-ALL models to investigate the mechanism underlying T-cell transformation using expression and methylation analyses. First, we performed transcriptome profiling of DNMT3A<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> T-ALL samples as



**Figure 3.** Development of acute leukemia in mice transplanted with *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> HSPC. **(a)** Kaplan–Meier survival curve of 1<sup>ary</sup> control (*MSCV Tet2*<sup>+/+</sup>), *DNMT3A*-mutated (*DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup>), *Tet2*-inactivated (*MSCV Tet2*<sup>-/-</sup>) and *DNMT3A*-mutated and *Tet2*-inactivated (*DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup>) mice (*n* = 8–15 per group). **(b)** Representative flow-cytometry analysis of bone marrow of a 1<sup>ary</sup> recipient control and an AML mouse (left). Top, percentage of GFP<sup>+</sup> cells; middle, Mac1<sup>+</sup> and Gr1<sup>+</sup> expression in GFP<sup>+</sup> cells showing myeloid populations and bottom, Kit<sup>+</sup> expression in GFP<sup>+</sup> populations is represented. Flow-cytometry analysis of bone marrow of a 1<sup>ary</sup> recipient control and a T-ALL mouse is represented as well (right). Top, percentage GFP<sup>+</sup> and middle, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> expression in GFP<sup>+</sup> cells were further gated showing T-lymphoid cells invasion. Bottom, TCR<sub>β</sub> expression in total GFP<sup>+</sup> population is represented. **(c)** Principal component analysis of expression profile from T-ALL samples compared with *Tet2*<sup>-/-</sup> and *Tet2*<sup>+/+</sup> thymocyte (left) and pathway analyses of genes differentially expressed between *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> T-ALL and *Tet2*<sup>+/+</sup> thymocytes (right). Complete list is provided in Supplementary Table S2.

well as T-ALL generated by BMT using known T-cell oncogenes: *TCL1A*<sup>27</sup> and *NOTCH1*<sup>L1601PΔP</sup><sup>28</sup>. We used DP thymocytes from *Tet2*<sup>-/-</sup> and *Tet2*<sup>+/+</sup> mice as a reference (Supplementary Table S1). Principal component analysis based on global expression profiles

identified three groups: (1) non-transformed *Tet2*<sup>+/+</sup> and *Tet2*<sup>-/-</sup> thymocytes, (2) *TCL1A*-induced T-ALLs and (3) *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> and *NOTCH1*<sup>L1601PΔP</sup> T-ALLs (Figure 3c, left). Differentially expressed genes between *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> and *Tet2*<sup>+/+</sup> thymocytes



(Supplementary Table S2) presented a marked overlap with known Notch pathway signatures (Figure 3c, right), consistent with their clustering close to *NOTCH1*<sup>L1601PΔP</sup> T-ALL samples in the principal component analysis.

Next, we compared DNA (hydroxy)methylation profiles between *DNMT3A*<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> T-ALLs, normal Tet2<sup>-/-</sup> thymocytes and other murine T-ALL samples (Supplementary Table S1). Analyses of the combination of these samples allowed us to associate DNA (hydroxy)methylation changes to Tet2 inactivation, *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant or the cooperation of Tet2-inactivation and *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant. First, we analyzed hydroxymethylated and methylated DNA immunoprecipitation (hMeDIP and MeDIP, respectively) sequencing data (Supplementary Tables S3 and S4).

Global hydroxymethylation is modified upon Tet2 inactivation, with almost all differentially hydroxymethylated regions (DhMRs) being hypo-hydroxymethylated (Figure 4a, top) and located in intergenic regions (Supplementary Figure S3A) as expected from the proposed function of Tet2 in regulating enhancer activity.<sup>15,29</sup> Tet2 inactivation was also associated with both hyper ( $n = 1115$ ) and hypo ( $n = 90$ ) DMRs (Figure 4a, bottom). *DNMT3A*<sup>R882H</sup> was not associated with hypo-DhMR but with some hyper-DhMRs, suggesting deregulation of the control of DNA hydroxymethylation. Both hyper and hypo-DMRs were in greater numbers in *DNMT3A*<sup>R882H</sup> than for Tet2 inactivation (2929 and 347, respectively), and frequently located in promoter regions for hypermethylation and in gene bodies for hypomethylation. The cooperation between those two previous conditions led to further deregulation of hydroxymethylation, some regions presenting less 5-hmC and some others more. The combination of both Tet2-inactivation and *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant presented almost the same number of DMR as compared with *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant alone, and did not markedly affect the repartition within the different genome annotations.

We then specifically analyzed the methylation at CpG island regions through the mouse genome, by representing the coverage of reads obtained from hMeDIP and MeDIP (Figure 4b). Tet2 inactivation was not associated with marked changes in 5-hmC or 5-mC contents, whereas *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant expression was

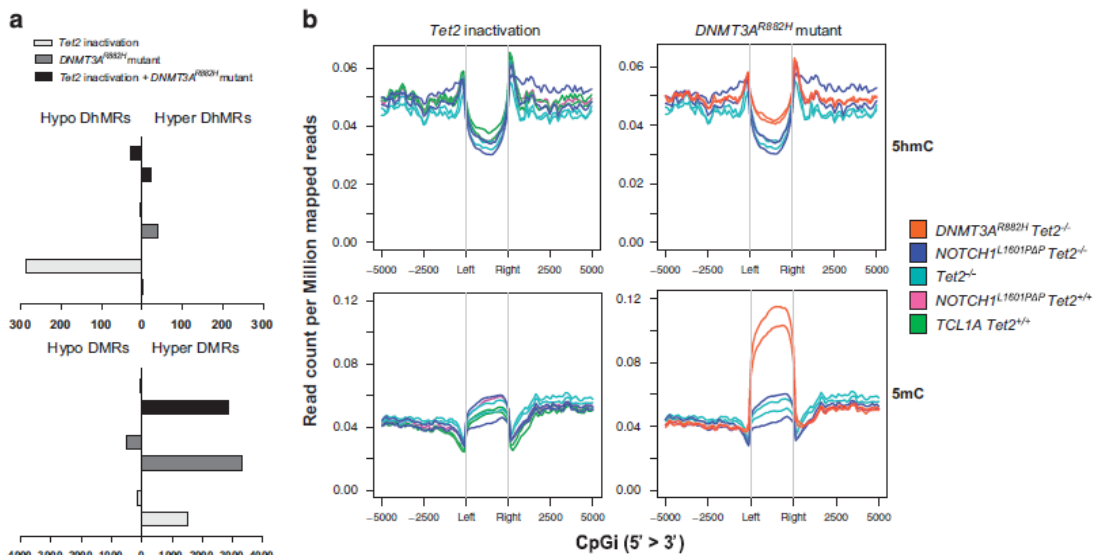
associated with higher 5-hmC levels and a strong increase in 5-mC. To obtain a more precise analysis of CpG methylation in *DNMT3A*<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> tumors, we performed RRBS on the same samples (Supplementary Table S1). CpG methylation was increased in *DNMT3A*<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> samples with respect to other T-ALLs and Tet2<sup>-/-</sup> samples (Supplementary Figure S3B) and DMRs could be identified between samples (Supplementary Table S5).

#### Specific transcriptional changes in tumoral *DNMT3A*<sup>R882H</sup>Tet2<sup>-/-</sup> cells

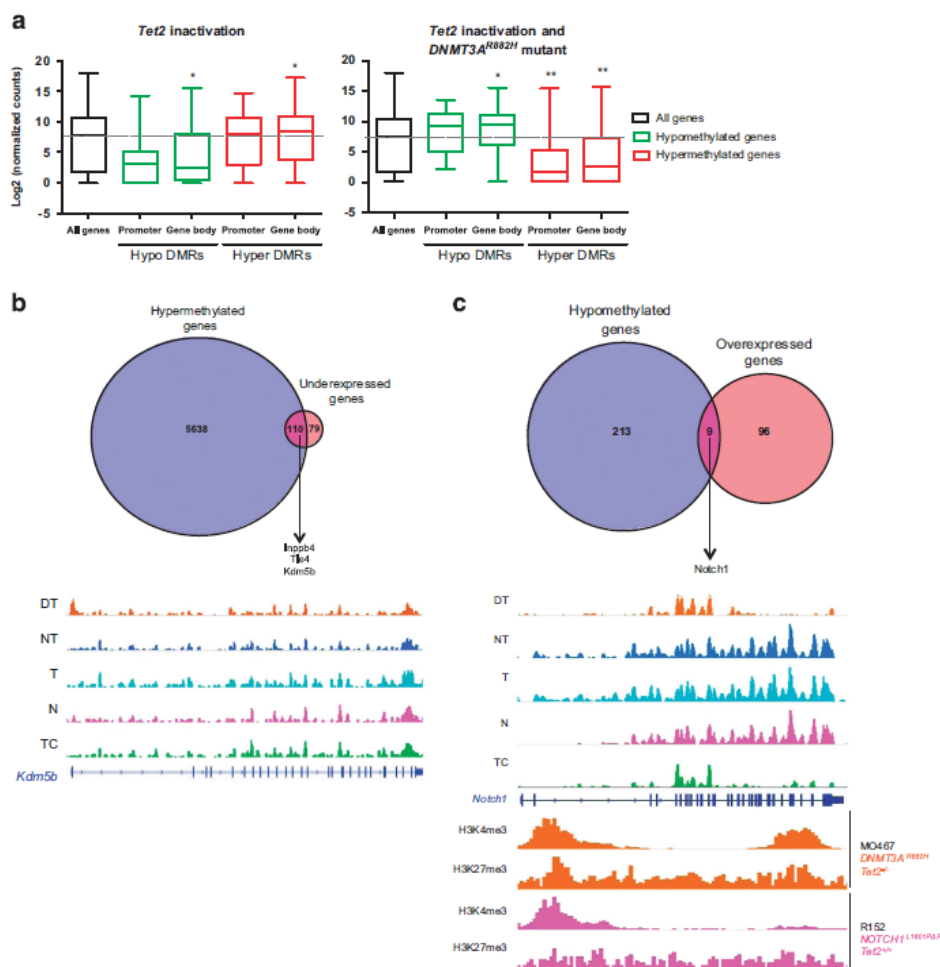
Mean expression in Tet2<sup>-/-</sup> context of DMR-associated gene showed statistical differences only when DMRs were located within gene bodies, hyper-DMR being associated with higher expression and hypo-DMR with low expression (Figure 5a). With *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant and Tet2 inactivation, hyper-DMRs were associated with lower gene expression, whereas hypo-DMRs were associated with higher expression.

We identified the genes that were statistically both hypermethylated and underexpressed in *DNMT3A*<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> cells (Figure 5b, top). 215 methylated CpG regions lie within 110 genes (Supplementary Table S6). The sequences of the methylated CpG regions significantly showed DNA binding sequences of T-cell transcription factors, Thpok (Zbtb7b), Tcf1 and Tcf7 (Supplementary Figure S4A). Thpok is a key regulator of CD4 lymphocytes differentiation and upregulated in *DNMT3A*<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> cells as compared with Tet2<sup>-/-</sup> cells (data not shown). Tcf1 is a known tumor suppressor in T-cell transformation and a negative regulator of the Notch pathway.<sup>30–32</sup> Methylation of its target sites may mimic inactivation of the gene itself, as suggested here by the statistically significant downregulation of the  $\beta$ -catenin pathway (Figure 3c). Other tumor suppressor genes, known to be inactivated during hematopoietic transformation such as *Inpp4b*<sup>33,34</sup> and *Tle4*<sup>(ref. 35)</sup> were among the 110 genes that both were hypermethylated and downregulated. An additional example is *Kdm5b*, which encodes a H3K4 demethylase (Figure 5b, bottom).

Nine genes were statistically both hypomethylated and overexpressed (Figure 5c top and Supplementary Table S7). Two of



**Figure 4.** Genome-wide methylation and hydroxymethylation changes in tumoral *DNMT3A*<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> cells. (a) Number of DhMRs (top) and DMRs (bottom) upon Tet2 inactivation, *DNMT3A*<sup>R882H</sup> expression and compound Tet2 inactivation with *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant expression. (b) Normalized CpG centered tag density profiles for 5-hmC (top) and 5-mC (bottom)  $\pm 5$  kb flanking regions upon Tet2-inactivation (left) and *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant expression (right). This plot represents the frequency of 5-(h)mC on CpG among the several T-ALL genotypes and highlights both a hypo-hydroxy and hypermethylation for *DNMT3A*<sup>R882H</sup> Tet2<sup>-/-</sup> samples. Two replicates per genotype were used.



**Figure 5.** Correlation between methylation and transcriptional profiles of *DNMT3A*<sup>R882H</sup>*Tet2*<sup>-/-</sup> tumoral cells. **(a)** Correlation between methylation on promoters or gene bodies and gene expression profiles associated with *Tet2* inactivation (left), and both *Tet2* inactivation and *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant expression (right). Significant differences in comparison with all genes are shown. \* $5e-02 < P < 1e-10$ ; \*\* $1e-10 < P < 1e-100$ ; \*\*\* $P < 1e-100$ . **(b)** Venn diagram showing hypermethylated and underexpressed genes associated with *Tet2* inactivation and *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant (top) and *Kdm5b* promoter hypermethylation in *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> sample (bottom). Methylation profiles of others T-ALLs and *Tet2*<sup>-/-</sup> non-transformed cells are used as controls (Supplementary Table S1). **(c)** Venn diagram showing hypomethylated and overexpressed genes associated with *Tet2* inactivation and *DNMT3A*<sup>R882H</sup> mutant (top) and *Notch1* gene body hypomethylation in *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> sample (bottom). Methylation profiles of others T-ALLs and *Tet2*<sup>-/-</sup> non-transformed cells are used as controls (Supplementary Table S1). Representative ChIPseq H3K4me3 and H3K27me3 marks performed on *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> cell line MO467 showing gain of H3K4me3 mark in gene body region of *Notch1* locus, as compared with *Notch1*<sup>L1601PAP</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup> cell line R152. DT = *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup>, NT = *NOTCH1*<sup>L1601PAP</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup>, T = *Tet2*<sup>-/-</sup>, N = *NOTCH1*<sup>L1601PAP</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup>, TC = *TCL1A* *Tet2*<sup>+/+</sup>, WT = *Tet2*<sup>+/+</sup> (Supplementary Table S1).

them, *Dtx1* and *Notch1* belong to the Notch pathway, which is essential for both normal and malignant T-cell differentiation. The hypomethylated region was located in the 3' part (Figure 5c, bottom) and was associated with *Notch1* overexpression in *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> tumor cells (Supplementary Figure S4B, top). Regarding *Dtx1* overexpression (Supplementary Figure S4B, bottom), the hypomethylated regions are also located in the 3' part of the gene (Supplementary Figure S4C). To assess histone methylation marks associated with transcription activation or repression on *Notch1* and *Dtx1* loci, we performed ChIPseq on *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> (MO467) or *NOTCH1*<sup>L1601PAP</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup> (R152) murine T-ALL established cell lines (Supplementary Table S1). Hypermethylated regions were associated with less H3K4me3, whereas hypomethylated regions were associated with H3K4me3 enrichment (Figure 5c bottom and Supplementary Figure S4D).

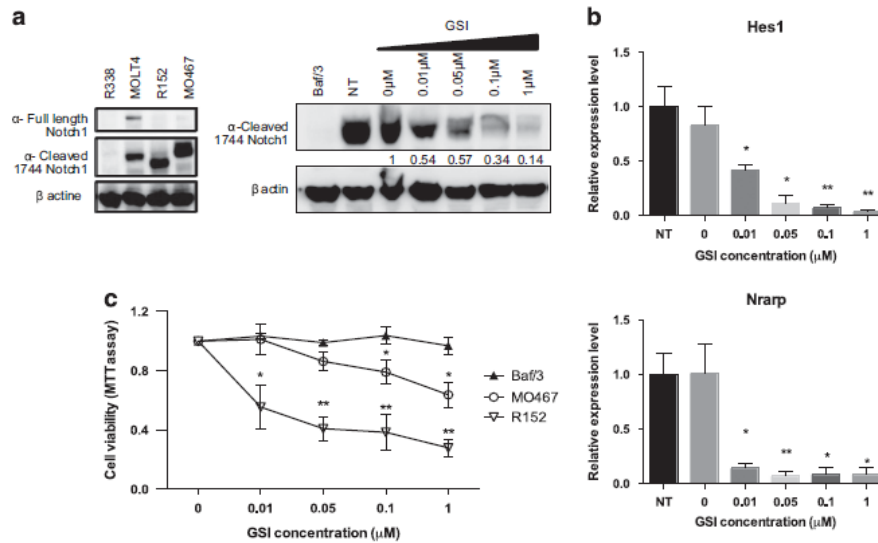
Altogether, these results highlight a synergistic effect of *Tet2*<sup>-/-</sup> inactivation and *DNMT3A*<sup>R882H</sup> overexpression on DNA

methylation and gene expression, resulting in both downregulation of tumor suppressor genes and upregulation of oncogenes, including Notch pathway genes.

#### Notch dependency of tumor *DNMT3A*<sup>R882H</sup>*Tet2*<sup>-/-</sup> cells

To functionally assess the role of the Notch pathway in this transformation process, we studied Notch dependency of MO467 (*DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup>) and R152 (*NOTCH1*<sup>L1601PAP</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup>) established T-ALL cell lines. Activation of the Notch pathway in MO467 cells was confirmed by the presence of cleaved Notch1 proteins (Figure 6a, left). Treatment of the cell lines with increasing amount of a  $\gamma$ -secretase inhibitor (GSI) led to decreased expression of the cleaved form of Notch1 (Figure 6a, right) and decreased expression of known Notch1 target genes: such as *Hes1* and *Nrarp* (Figure 6b). GSI treatment led to reduced viability/proliferation of *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> and *NOTCH1*<sup>L1601PAP</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup>





**Figure 6.** Notch dependency of tumoral *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> cells. **(a)** Notch1 full-length or cleaved protein levels in murine *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> cell line MO467 show no full-length Notch1 protein as well as in *Notch1*<sup>L1601PΔP</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup> cell line R152 (left). The human T-ALL cell line MOLT4 is used as a positive control, and the murine T-ALL cell line R338 (from a *Ezh2*-deficient background) is used as a negative control. Notch1 cleaved protein levels in murine *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> cell line MO467 show a reduction of protein level among increasing amount of GSI doses (right). The murine cell line Baf/3 is used as a negative control. **(b)** qRT-PCR validation of selected *Notch1* target genes *Hes1* (top) and *Nrarp* (bottom) downregulation upon GSI treatment during 48 h. NT = non-treated. Each value represents the mean ± s.e.m. (*n* = 3) of three independent experiments. **(c)** MTT assay on murine *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> cell line MO467 treated during 48 h with increasing amount of GSI. The murine Baf/3 cell line is used as a negative control, and the murine *Notch1*<sup>L1601PΔP</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup> cell line R152 is used as a positive control. Each value represents the mean ± s.e.m. (*n* = 3) of three independent experiments. Significant differences in comparison with Baf/3 cells are indicated \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01.

cells but not of Ba/F3 cells (Figure 6c) and was associated with an increased proportion of cells in G0/G1 and decrease of cells in S-phase in both *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> (Supplementary Figure S5A and B) and *NOTCH1*<sup>L1601PΔP</sup> *Tet2*<sup>+/+</sup> (data not shown) cell lines. We confirmed these results by treating R158 (*NOTCH1*<sup>L1601PΔP</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup>) and R467 (*DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup>) primary cells cultured on MSS and MSS-DL1 feeders, with another GSI (DAPT). *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> T-ALL cells proliferate in a Notch-dependent manner similarly to *NOTCH1*<sup>L1601PΔP</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> T-ALL cells, although they do not respond to classical Notch activation by DL1 ligand (Supplementary Figure S5C). Furthermore, an increased proportion of both apoptotic and G0/G1 *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> T-ALL cells is observed (Supplementary Figure S5D and E).

## DISCUSSION

Here, we report that concomitant *DNMT3A*<sup>R882H</sup> expression and loss of *Tet2* in mouse HSPC lead to both myeloid and lymphoid hematological malignancies. The AML-like disease developed by 10% of *DNMT3A*<sup>R882H</sup> *Tet2*<sup>-/-</sup> mice is consistent with the recurrence of these mutations in human AML. The T-lymphoid diseases are more frequent, in keeping with the tight association between these mutations in human AITL. As the abnormal expansion of myeloid and T cells is observed in different organs, marrow and blood respectively, the microenvironment may have an important role in determining the amplified lineages.<sup>36</sup>

Our model represents the first cooperative murine model involving *Tet2* inactivation in T-cell malignancies. In many aspects, these results are in accordance with *Dnmt3a*-null mice, which also develop both lymphoid and myeloid malignancies.<sup>37,38</sup> We however did not observe B-cell malignancies, in keeping with the human situation: B-lymphoid malignancies essentially lack *DNMT3A* mutations in human.

The combination of *Tet2* loss and *DNMT3A*<sup>R882H</sup> expression resulted in high hydroxymethylation and methylation disorder. *DNMT3A*<sup>R882H</sup>-associated hypermethylation correlated with low expression of tumor suppressor loci and hypomethylation associated with high expression of oncogene. In our model, among the widespread DNA methylation aberrations, only few genes may have functional impact. This is exemplified by hypomethylation and overexpression of the *Notch1* and *Dtx1* genes, which results in the activation of the Notch pathway, a major oncogenic pathway in T-cell malignancies. Other abnormalities may sustain T-cell transformation, such as low expression of *Tcf1*, leading to the downregulation of the Wnt/β catenin pathway, as reported in a fraction of peripheral T-cell lymphoma,<sup>39</sup> together with methylation of the promoters of target genes. Overexpression of *Zbtb7b* may be involved in the generation of hyper-DMRs and cellular transformation.<sup>40</sup>

Finally, the high frequency of *DNMT3A* mutations in adult T-ALL<sup>41,42</sup> may be associated with *NOTCH1* hypomethylation causing high *NOTCH1* expression during T-cell differentiation and subsequent occurrence of *NOTCH1* activation mutation to induce T-ALL. With age, our mouse model consistently develops an AITL-like disease, a lymphoma occurring in the elderly in human and for which only few mouse models exist.<sup>43,44</sup> Given that AITL cells could not be engrafted aside from subsequent progenitors transplantation along with a decrease in the GFP<sup>+</sup> proportion, their isolation in sufficient number for functional analyses was precluded. The AITL phase is preceded by an expansion of the CD4<sup>+</sup> T-cell compartment, and associated with high *Notch1* and *Dtx1* expression (data not shown). The link between early expansion of the CD4<sup>+</sup> population and subsequent development of AITL-like disorder is at the moment speculative, but may rely on high expression *Thpok* and of *Notch1* during thymocytes differentiation. Recently, immunohistochemical

analyses of human samples uncovered NOTCH1 activation in up to 38% of peripheral T-cell lymphoma samples.<sup>45</sup>

The relative low number of transformations observed in primary recipients likely reflects the insufficiency of TET2 and DNMT3A mutations to drive full transformation. The observed bias toward T-cell abnormalities might be due to impaired methylation, which has been suggested to protect from lymphoid differentiation.<sup>46</sup> Serial transplantations might facilitate epigenetic drift, leading to Notch1 overexpression and CD4<sup>+</sup> T-cell accumulation.

Together, our data support the idea that Notch pathway activation represents an important survival signal for abnormal T<sub>fh</sub> cells. Interaction with B lymphocyte and myeloid cells might substitute for Notch survival signals required by these abnormal T<sub>fh</sub> cells<sup>47</sup> and/or for T-cell survival.<sup>48</sup>

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank members of the Bernard laboratory for helpful discussions, Julie Mouillaux for her involvement in this project, Patrick Gonin from the Gustave Roussy animal facility for excellent mouse care as well as Yann Leduse and Philippe Rameau from the Gustave Roussy Flow Cytometry Core Facility. We also thank the Gustave Roussy Genomic Platform for high-throughput sequencing. Work in the laboratory was supported by grants from INSERM, Institut National du Cancer (INCA), 2013-1-PL BIO-09, INCa-DGOS-INSERM 6043, Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and Association Laurette Fugain. The work in the laboratory of KH was supported by the Danish Cancer Society, the European Research Council (294666\_DNAMET), the Danish National Research Foundation (DNRF82) and the Novo Nordisk Foundation. LS is supported by fellowships from Cancéropôle Ile de France and Fondation Association pour la recherche sur le Cancer (ARC).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

LS drafted the manuscript. LS and LC designed, performed and analyzed results. VDV, EIM, JC, EnM, CkL, NM, ND, PG, MW, FP, MP, AB and KH performed experiments and analyzed data. MBD, PhD, MF, SG and PaD analyzed results. TM designed experiments, analyzed results and drafted the manuscript. OAB designed the project, experiments and wrote the manuscript.

#### REFERENCES

- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; **363**: 2424–2433.
- Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; **43**: 309–315.
- Couronne L, Bastard C, Bernard OA. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2012; **366**: 95–96.
- Kim SJ, Zhao H, Hardikar S, Singh AK, Goodell MA, Chen T. A DNMT3A mutation common in AML exhibits dominant-negative effects in murine ES cells. *Blood* 2013; **122**: 4086–4089.
- Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R et al. The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers. *Cancer Cell* 2014; **25**: 442–454.
- Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet* 2012; **44**: 23–31.
- Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009; **360**: 2289–2301.
- Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2011; **20**: 25–38.
- Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2009; **41**: 838–842.
- Scourzic L, Mouly E, Bernard OA. TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. *Genome Med* 2015; **7**: 9.

- Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ, Rosen EA, Poveromo L, Elf S et al. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2015; **125**: 327–335.
- Kameda T, Shide K, Yamaji T, Kamiunten A, Sekine M, Taniguchi Y et al. Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. *Blood* 2015; **125**: 304–315.
- Lobry C, Ntziachristos P, Ndiaye-Lobry D, Oh P, Cimmino L, Zhu N et al. Notch pathway activation targets AML-initiating cell homeostasis and differentiation. *J Exp Med* 2013; **210**: 301–319.
- Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y et al. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med* 2013; **210**: 2627–2639.
- Rasmussen KD, Jia G, Johansen JV, Pedersen MT, Rapin N, Bagger FO et al. Loss of TET2 in hematopoietic cells leads to DNA hypermethylation of active enhancers and induction of leukemogenesis. *Genes Dev* 2015; **29**: 910–922.
- Shih AH, Jiang Y, Meydan C, Shank K, Pandey S, Barreiro L et al. Mutational cooperativity linked to combinatorial epigenetic gain of function in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2015; **27**: 502–515.
- Soucie E, Hanssens K, Mercher T, Georjina-Lavialle S, Damaj G, Livideanu C et al. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood* 2012; **120**: 4846–4849.
- Palomero T, Couronne L, Khiabani H, Kim MY, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet* 2014; **46**: 166–170.
- Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* 2014; **46**: 171–175.
- Lemonnier F, Couronne L, Parrens M, Jais JP, Travert M, Lamant L et al. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood* 2012; **120**: 1466–1469.
- Malinge S, Ragu C, Della-Valle V, Pisani D, Constantinescu SN, Perez C et al. Activating mutations in human acute megakaryoblastic leukemia. *Blood* 2008; **112**: 4220–4226.
- Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen JV, Cloos PA, Rappsilber J et al. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* 2011; **473**: 343–348.
- Gu H, Smith ZD, Bock C, Boyle P, Gnirke A, Meissner A. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat Protoc* 2011; **6**: 468–481.
- Thiollier C, Lopez CK, Gerby B, Ignacimoutou C, Poglio S, Duffourd Y et al. Characterization of novel genomic alterations and therapeutic approaches using acute megakaryoblastic leukemia xenograft models. *J Exp Med* 2012; **209**: 2017–2031.
- Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 2011; **29**: 621–663.
- de Leval L, Rickman DS, Thielen C, Reynies A, Huang YL, Delsol G et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* 2007; **109**: 4952–4963.
- Virgilio L, Lazzeri C, Bichi R, Nibu K, Narducci MG, Russo G et al. Deregulated expression of TCL1 causes T cell leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 3885–3889.
- Chiang MY, Xu L, Shestova O, Histen G, L'Heureux S, Romany C et al. Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3181–3194.
- Tsagaratou A, Aijo T, Lio CW, Yue X, Huang Y, Jacobsen SE et al. Dissecting the dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in T-cell development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**: E3306–E3315.
- Steinke FC, Yu S, Zhou X, He B, Yang W, Zhou B et al. TCF-1 and Lef-1 act upstream of Th-POK to promote the CD4(+) T cell fate and interact with Runx3 to silence Cd4 in CD8(+) T cells. *Nat Immunol* 2014 Jul; **15**: 646–656.
- Yu S, Xue HH. TCF-1 mediates repression of Notch pathway in T lineage-committed early thymocytes. *Blood* 2013; **121**: 4008–4009.
- Staal FJ, Clevers H. Tales of the unexpected: Tcf1 functions as a tumor suppressor for leukemias. *Immunity* 2012; **37**: 761–763.
- Li Chew C, Lunardi A, Gulluni F, Ruan DT, Chen M, Salmena L et al. In vivo role of INPP4B in tumor and metastasis suppression through regulation of PI3K-AKT signaling at endosomes. *Cancer Discov* 2015; **5**: 740–751.
- Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, Nanjo H, Takasuga S, Liu H et al. INPP4B is a PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase that can act as a tumor suppressor. *Cancer Discov* 2015; **5**: 730–739.
- Greif PA, Eck SH, Konstantin NP, Benet-Pages A, Ksienzyk B, Dufour et al. Identification of recurring tumor-specific somatic mutations in acute myeloid leukemia by transcriptome sequencing. *Leukemia* 2011; **25**: 821–827.



- 36 Wei J, Wunderlich M, Fox C, Alvarez S, Cigudosa JC, Wilhelm JS *et al*. Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell* 2008; **13**: 483–495.
- 37 Mayle A, Yang L, Rodriguez B, Zhou T, Chang E, Curry CV *et al*. Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation. *Blood* 2015; **125**: 629–638.
- 38 Peters SL, Hlady RA, Opavska J, Klinkebiel D, Pirruccello SJ, Talmon GA *et al*. Tumor suppressor functions of Dnmt3a and Dnmt3b in the prevention of malignant mouse lymphopoiesis. *Leukemia* 2014; **28**: 1138–1142.
- 39 Dorfman DM, Greisman HA, Shahsafaei A. Loss of expression of the WNT/beta-catenin-signaling pathway transcription factors lymphoid enhancer factor-1 (LEF-1) and T cell factor-1 (TCF-1) in a subset of peripheral T cell lymphomas. *Am J Pathol* 2003; **162**: 1539–1544.
- 40 Lee HO, He X, Mookerjee-Basu J, Zhongping D, Hua X, Nicolas E *et al*. Disregulated expression of the transcription factor ThPOK during T-cell development leads to high incidence of T-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; **112**: 7773–7778.
- 41 Grossmann V, Haferlach C, Weissmann S, Roller A, Schindela S, Poetzinger F *et al*. The molecular profile of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: mutations in RUNX1 and DNMT3A are associated with poor prognosis in T-ALL. *Genes Chromosomes Cancer* 2013; **52**: 410–422.
- 42 Neumann M, Heesch S, Schlee C, Schwartz S, Gokbuget N, Hoelzer D *et al*. Whole-exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of DNMT3A mutations. *Blood* 2013; **121**: 4749–4752.
- 43 Ellyard JI, Chia T, Rodriguez-Pinilla SM, Martin JL, Hu X, Navarro-Gonzalez M *et al*. Heterozygosity for Roquin5 leads to angioimmunoblastic T-cell lymphoma-like tumors in mice. *Blood* 2012; **120**: 812–821.
- 44 Muto H, Sakata-Yanagimoto M, Nagae G, Shiozawa Y, Miyake Y, Yoshida K *et al*. Reduced TET2 function leads to T-cell lymphoma with follicular helper T-cell-like features in mice. *Blood Cancer J* 2014; **4**: e264.
- 45 Kluk MJ, Ashworth T, Wang H, Knoechel B, Mason EF, Morgan EA *et al*. Gauging NOTCH1 activation in cancer using immunohistochemistry. *PLoS One* 2013; **8**: e67306.
- 46 Broske AM, Vockentanz L, Kharazi S, Huska MR, Mancini E, Scheller M *et al*. DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet* 2009; **41**: 1207–1215.
- 47 Auderset F, Schuster S, Fasnacht N, Coutaz M, Charmoy M, Koch U *et al*. Notch signaling regulates follicular helper T cell differentiation. *J Immunol* 2013; **191**: 2344–2350.
- 48 Fasnacht N, Huang HY, Koch U, Favre S, Auderset F, Chai Q *et al*. Specific fibroblastic niches in secondary lymphoid organs orchestrate distinct Notch-regulated immune responses. *J Exp Med* 2014; **211**: 2265–2279.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)



## Abstract

---

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALLs) is a T cell progenitor proliferation malignancy that mostly occurs in children and young adults. Over the years, intrinsic and extrinsic factors have been demonstrated to play a role in initiation and onset of the leukemic proliferation. Among other organs, T-ALL expands in most cases in various Bone Marrow (BM) sites. These niches have a complex cellular composition with hematopoietic, stromal, endothelial, nervous cells and also adipocytes that form the Medullar Adipose Tissue (MAT). Two types of MAT exist in the BM niches. The constitutive MAT takes place in long bones extremities whereas the regulated MAT arises and grows as a results of external stimuli like aging and BM ablation. Mice harbor both constitutive MAT enriched and deprived BM niches respectively in tail and thoracic vertebrae. Hence, using *in vivo* models we observed that mouse and human T-ALL develop slowly in tail compared to thoracic vertebrae. Tail-derived T-ALL cells display lowered cell surface marker expression, decreased metabolism and cell cycle progression demonstrating a dormancy phenotype. Functionally tail-derived T-ALL cells exhibit a deficient short-term *ex vivo* growth and a delayed *in vivo* propagation. These features are non-cell autonomous as T-ALL from tail and thorax share identical genomic abnormalities, and also functional disparities disappear *in vivo* and in prolonged *in vitro* assays. Importantly, tail-derived T-ALL display higher intrinsic resistance to cell cycle-related drugs, *i.e.* Vincristine sulfate and Cytarabine. Moreover, T-ALL recovered from gonadal adipose tissues or from co-cultures with adipocytes share metabolic, cell cycle and phenotypic or chemoresistance features with tail-derived T-ALL. These results demonstrate that BM niches differentially orchestrate T-ALL propagation and that adipocyte enriched BM protects T-ALL during drug treatments. To support these findings, single cell RNA sequencing analysis suggests that a few thoracic derived T-ALL cells exhibit a similar mRNA expression pattern to those from the tail. Altogether, these results emphasize the hypothesis of chemoresistance inducing niche among the thoracic hematopoietic-enriched adipocytes-deprived BM.

**Key words:** T cell acute lymphoblastic leukemia, microenvironment, adipocytes, chemoresistance.

## Résumé

---

Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont des maladies des progéniteurs T qui surviennent principalement chez l'enfant et le jeune adulte. Des facteurs intrinsèques et extrinsèques à la cellule leucémique sont impliqués dans l'initiation et l'expansion leucémique. Les cellules leucémiques infiltrent de nombreux organes dont la Moelle Osseuse (MO) des patients. La MO est composée du tissu hématopoïétique, de cellules stromales, endothéliales, nerveuses et d'adipocytes aussi nommé tissu adipeux médullaire (MAT). Deux types de MAT coexistent, le MAT constitutif, qui concerne les extrémités de certains os et le MAT régulé, qui est généré et s'accroît en réponse à de nombreux stimuli (vieillesse, myéloablation). Chez la souris, les vertèbres thoraciques et caudales contiennent respectivement de la MO pauvre et riche en MAT constitutif. A l'aide du modèle de transplantation *in vivo*, nous avons observé que les cellules leucémiques de LAL-T humaines et de souris se développent dans les deux territoires médullaires. En revanche, comparées aux cellules leucémiques extraites des vertèbres thoraciques, celles récupérées à partir des vertèbres caudales présentent une expression de marqueurs de surface, un métabolisme global et une progression dans le cycle cellulaire diminuées démontrant un phénotype de dormance. Fonctionnellement, les cellules leucémiques extraites des vertèbres caudales présentent une expansion *ex vivo* et une propagation *in vivo* moindre que celles des vertèbres thoraciques. Ces caractéristiques sont le résultat d'une éducation cellulaire indépendante des facteurs intrinsèques puisque les cellules de LAL-T présentent des anomalies génétiques identiques entre les deux territoires médullaires. De plus, cette éducation est un état réversible puisque la transplantation en souris secondaires ou la co-culture à long terme annihile l'ensemble des phénotypes observés dans les vertèbres caudales. Enfin, les cellules leucémiques des vertèbres caudales présentent une résistance intrinsèque plus élevée aux drogues ciblant le cycle cellulaire, *i. e.* la Vincristine et la Cytarabine mise également en évidence par un protocole *in vivo*. De façon intéressante, les cellules leucémiques issues du tissu adipeux des gonades ou co-cultivées avec des adipocytes dérivés de cellules stromales partagent les caractéristiques phénotypiques, métaboliques, de progression dans le cycle cellulaire et de chimiorésistance avec les cellules de LAL-T issues des vertèbres caudales. Ces résultats démontrent que les sites de MO orchestrent différemment la propagation des LAL-T et que la MO riche en adipocytes protège les LAL-T des agents utilisés en chimiothérapie. L'analyse transcriptomique préliminaire menée à l'échelon unicellulaire des cellules leucémiques a permis de montrer l'existence d'une population minoritaire dans les vertèbres thoraciques qui partagent une signature transcriptomique commune avec les cellules leucémiques issues des vertèbres caudales. Ces résultats soutiennent l'hypothèse de l'existence d'une niche responsable de la chimiorésistance des cellules leucémiques dans la MO riche en cellules hématopoïétiques et pauvres en adipocytes.

**Mots clés:** leucémies aiguës lymphoblastiques T, microenvironnement, adipocytes, chimiorésistance.