

### Nouvelles stratégies de sensibilisation des Cellules Souches Leucémiques en ciblant l'axe BCR-ABL/BMI1 Fabien Muselli

### ▶ To cite this version:

Fabien Muselli. Nouvelles stratégies de sensibilisation des Cellules Souches Leucémiques en ciblant l'axe BCR-ABL/BMI1. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ6048 . tel-03484311

### HAL Id: tel-03484311 https://theses.hal.science/tel-03484311

Submitted on 17 Dec 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.





# **THÈSE DE DOCTORAT**

Nouvelles stratégies de sensibilisation des Cellules Souches Leucémiques en ciblant l'axe BCR-ABL/BMI1

## Fabien MUSELLI

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire C3M U1065

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université Côte d'Azur, Spécialité Interactions Moléculaires et Cellulaires

Dirigée par Dr Didier MARY Soutenue le : 16 Décembre 2020 Devant le jury, composé de :

Dr Frédéric BOST, *DR CNRS, Université Côte d'Azur* Dr Véronique MAGUER-SATTA, *DR CNRS, Université de Lyon* Dr Stéphane PROST, *Chercheur CEA, Paris Saclay* Dr Jean-Max PASQUET, *DR INSERM, Université de Bordeaux* Dr Hana RASLOVA, *DR INSERM, Institut Gustave Roussy* Dr Didier MARY, *CR INSERM, Université Côte d'Azur* 



### Nouvelles stratégies de sensibilisation des Cellules Souches Leucémiques en ciblant l'axe BCR-ABL/BMI1

#### Devant le jury, composé de :

#### Président du jury

Dr Frédéric BOST, Directeur de Recherche, DR2, CNRS, Université Côte d'Azur

#### Rapporteurs

Dr Véronique MAGUER-SATTA, Directrice de Recherche, DR1, CNRS, Université de Lyon Dr Stéphane PROST, Chercheur CEA HDR, Paris Saclay

#### Examinateurs

Dr Jean-Max PASQUET, Directeur de Recherche, DR2, INSERM, Université de Bordeaux Dr Hana RASLOVA, Directrice de Recherche, DR2, INSERM, Institut Gustave Roussy

#### Directeur de thèse

Dr Didier MARY, Chargé de Recherche, CRCN HDR, INSERM, Université Côte d'Azur

### Résumé:

La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est la première maladie cancéreuse ayant permis de démontrer l'intérêt et l'efficacité d'une thérapie ciblée. Dans la grande majorité des cas, les patients atteints de LMC répondent au traitement par inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) avec une amélioration considérable de leur qualité de vie sans que la maladie ne soit totalement éradiquée ce qui nécessite de maintenir le traitement à vie avec d'éventuels effets secondaires associés. Par ailleurs, environ 10% des patients restent réfractaires à ce type de thérapie. Ces deux problèmes sont la conséquence de l'insensibilité aux ITKs des Cellules Souches Leucémiques (CSLs) aux ITKs. Ce travail de thèse visait à identifier et à caractériser de nouvelles approches pharmacologiques permettant le ciblage des CSL. Sur la base des résultats de l'équipe concernant l'oncogène BMI1, une molécule clé de l'auto-renouvellement des CSL, j'ai mis en place deux stratégies :

Dans une première approche j'ai pu démontrer qu'il était pertinent de cibler pharmacologiquement la Protéine Kinase C delta (PKCδ) après avoir observé et démontré qu'elle jouait un rôle très important dans la survie des CSLs en contrôlant l'expression de BMI1. L'inhibition spécifique de la PKCδ semble suffisante pour diminuer le nombre de CSLs et un inhibiteur de PKCδ associé à un ITK permet d'accroître la sensibilité des CSLs à cet ITK. Les étapes moléculaires affectées par l'inhibition de la PKCδ concernent essentiellement les processus apoptotiques mitochondriaux avec notamment la disparition des facteurs anti-apoptotiques.

La deuxième approche concerne l'Alexidine (ALX) appartenant à la famille des bisbiguanides que nous avons identifiée en interrogeant la base de données du Connectivity Map à l'aide d'un transcriptome obtenu après « silencing » de BMI1 dans la lignée K562. L'ALX stimule la phosphorylation de l'AMPK et induit la mort cellulaire des cellules sensibles et résistantes à l'Imatinib. Des analyses biologiques réalisées à partir d'échantillons primaires provenant de prélèvements médullaires de patients répondeurs et non-répondeurs à l'imatinib, ont montré que la combinaison ITK/ALX permet de purger 90% du pool de CSLs. Ce type de combinaison induit également la mort cellulaire des lignées de LMC qu'elles soient sensibles ou résistantes à l'Imatinib, avec une très forte synergie que l'ITK utilisé soit de première, seconde ou troisième génération. L'ALX inhibe la respiration mitochondriale des cellules leucémiques en amont du déclenchement des processus apoptotiques, perturbant ainsi leurs processus énergétiques et aboutissant à leur mort.

Nous avons ainsi mis en évidence deux ciblages moléculaires distincts dans l'axe BCR-ABL/BMI1 qui vont conduire à de fortes perturbations au niveau mitochondrial contribuant à sensibiliser les CSLs aux ITKs. L'ensemble des résultats permet de proposer deux types d'approches pharmacologiques nouvelles chacune d'entre elles pouvant être combinée à n'importe quel ITK pour atteindre le compartiment souche leucémique. Ce type d'approche laisse envisager la possibilité de combinaisons de molécules susceptibles de traiter les patients aujourd'hui insensibles aux thérapies ciblées proposées, ainsi que de traiter définitivement ceux nécessitant aujourd'hui d'un traitement à vie.

#### Mots Clés :

Leucémie Myéloïde Chronique, Cellules Souches Leucémiques, Bisbiguanides, PKC delta, BMI1, BCR-ABL

### Abstract:

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is the first cancer for which targeted therapy was shown to be effective. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) greatly improved most patients' quality of life but failed to completely eradicate the disease. Therefore, patients require life-long treatment that possibly come with long-term side effects. Furthermore, 10% of CML patients do not respond to TKI treatment. Studies suggest that the cause of this intrinsic resistance is the persistence of leukemic stem cells (LSC) resistant to TKIs. In the current study, my goals were to identify and characterize new pharmacological approaches targeting LSC. Previous data from our team, related to the oncogene BMI1, a key molecule in the process of LSC self-renewal allowed me to draw out two strategies.

Firstly, I showed that through its regulation of BMI1 expression, the delta isoform of the protein kinase C delta (PKC $\delta$ ) is crucial in LSC survival. Specifically, inhibiting PKC $\delta$  alone, decreases the number of LSCs. Moreover, combining a PKC $\delta$  inhibitor to a TKI potentiates TKI targeting of LSCs. The molecular pathways altered by the inhibition of PKC $\delta$  essentially depend on mitochondrial apoptotic processes, in particular, with the loss of anti-apoptotic proteins.

My second approach was to characterize the effects of Alexidine (ALX) a molecule of the bisbiguanide family, which we identified through the Connectivity Map database, using a transcriptomic dataset in which BMI1 was silenced in the K562 cell line. ALX results in AMPK phosphorylation and cell death of both sensitive and resistant cells to Imatinib. Biochemical experiments on primary cells obtained from bone marrow biopsies of patients, considered as responders but also from non-responders to Imatinib, showed that combining TKI to ALX eliminates 90% of LSCs. ALX synergizes with first-, second-, and third-generation TKI and induce cell death in CML cell lines, both sensitive and resistant to Imatinib. In leukemic cells, ALX inhibits mitochondrial respiration before it induces apoptosis, altering their energy metabolism and eventually leading to cell death.

We have shown that targeting two distinct molecular steps of the BCR-ABL/BMI1 axis leads to mitochondrial dysfunction and contributes to sensitizing LSC to TKI. Our research puts forth two novel pharmacological strategies, which can be combined to all TKIs to reach and eradicate the stem cell compartment. Not only does this type of approach clear the way for the possibility of combining molecules to treat patients unresponsive to prevailing targeted therapies, but it also offers the prospect of curing patients for good.

#### Keywords :

Chronic Myeloid Leukemia, Leukemic Stem Cells, Bisbiguanides, PKC delta, BMI1, BCR-ABL

### Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement l'ensemble des membres du Jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci aux Docteurs MAGUER-SATTA Véronique et PROST Stéphane, mes deux rapporteurs. Merci aux Docteurs PASQUET Jean-Max et RASLOVA Hanna, mes deux examinateurs. Je remercie également le Docteur BOST Frédéric de m'avoir fait l'honneur d'être le président de mon jury de thèse. Merci pour les discussions enrichissantes que nous avons eu à l'oral qui ont pu ouvrir des perspectives très intéressantes pour la suite de ce projet !

Je remercie les Docteurs PASQUET Jean-Max (une nouvelle fois !) et ROCHET Nathalie d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Les discussions que nous avons pu avoir ont considérablement enrichi mon travail, merci pour vos encouragements et votre soutien !

Je tiens également à remercier la Ligue Nationale contre le Cancer pour m'avoir accordé une année supplémentaire pour compléter mes travaux.

Merci à tous les membres de mon équipe ! Jean-François, merci de m'avoir accueilli 4 ans (plus un mois !) au sein du laboratoire. Marielle, Véro, Raphaël, Giulia, merci pour ce temps passé ensemble ! Un grand merci à Ruxanda, ma co-thésarde, pour ton aide avec cette mystérieuse machine que fut pour moi le FACS au départ et pour toutes nos discussions. Je ne désespère pas de pouvoir parler russe un jour mais il faudra un certain temps ahaha ! Anne-Laure "petit élan de 2-3 ans ou fais pas l'fou" et Wassila alias "Silou", Anatole, Anne-Sophie, Rita, merci pour tous les bons moments que nous avons pu passer ! Merci à Soumaya ! Malgré ton passage éclair au labo, tu m'as bien fait rire et je te souhaite tous mes voeux de réussites pour ton futur ! J'admire vraiment la détermination dont tu fais preuve !

Didier, mon directeur de thèse, "Le Professeur", par où commencer... Les mots me manquent pour te remercier. Tu m'as offert une belle opportunité de travail et je suis fier de ce que nous avons pu accomplir. J'ai tellement appris en si peu de temps et gagné en maturité grâce à tes conseils avisés et ton soutien même quand rien ne fonctionnait ! Nonobstant toute réflexion superfétatoire, ton précieux vocabulaire m'a sans aucun doute permis de réachalanger mes propos tout au long de mon parcours et au delà. J'ai beaucoup apprécié nos nombreuses disussions qu'elles soient scientifiques ou autre !

Je remercie tous mes collègues du C3M avec qui j'ai partagé mes études et notamment ces années de thèse. Merci à Robinou, frère de bataille ! Serena, alias "Granchietta" or "the French

Milanese" you will be the next one ! Mickael et Christophe, merci pour vos conseils et votre soutien ! Nathan, big-up à toi pour ton aide et ton soutien ! Toi même tu sais ! Un grand merci à Maéva et à Marie de la plateforme imagerie pour votre aide technique et vos conseils ! Els, merci beaucoup pour ton aide et tes conseils ! Ce fut un plaisir de pouvoir collaborer avec toi !

Merci à tous mes amis qui m'ont soutenu depuis tant d'années. Margaux, Fadidou, Amaubro, Claudine, John, Christopher, ... Je n'ai pas assez de mots pour tous vous remercier !

Mes derniers remerciements vont à ma famille et à mes proches qui me soutiennent et m'encouragent dans tout ce que j'entreprends.

## Sommaire

Liste des abréviations4
Liste des figures7
I. La Leucémie Myéloïde Chronique9
I.1 Epidémiologie9
I.2 Symptomatologie de la Leucémie Myéloïde Chronique9
I.3 Facteurs étiologiques de la Leucémie Myéloïde Chronique10
I.4 Evolution de la Leucémie Myéloïde Chronique11
I.5 Anomalie oncogénique de la Leucémie Myéloïde Chronique : BCR-ABL 13
I.6 Critères de diagnostic dans la Leucémie Myéloïde Chronique20
I.7 Prise en charge thérapeutique de la Leucémie Myéloïde Chronique 22
I.7.1 Les traitements de la Leucémie Myéloïde Chronique22
I.7.1.1 Historique de la prise en charge de la Leucémie Myéloïde Chronique22
I.7.1.2 Traitements actuels de la Leucémie Myéloïde Chronique25
I.7.1.3 Suivi et adaptation des traitements
I.7.1.4 Facteurs pronostics de la Leucémie Myéloïde Chronique30
I.7.1.5 Traitements de la Leucémie Myéloïde Chronique réfractaire ou récidivante
II. Les différents mécanismes de résistance aux Inhibiteurs de Tyrosine Kinase dans la Leucémie Myéloïde Chronique32
II.1 Les résistances dépendantes de BCR-ABL
II.1.1 Mutations dans le domaine kinase ABL
II.1.2 Amplification de BCR-ABL37
II.2 Les résistances indépendantes de BCR-ABL
II.2.1 Biodisponibilité de l'inhibiteur de tyrosine kinase
II.2.2 Transporteurs d'efflux
II.2.3 Transporteurs d'influx
II 2.1 La pieta hématanaïétique
II.2. I La niche hemalopolelique

II.2.1.1 Le microenvironnement médullaire : une plate signalisation	eforme de 44
II.2.1.2 Dérégulations de la niche hématopoïétique : prédisp hémopathies malignes	osition aux 47
I. Les Cellules Souches Leucémiques	51
III.1 Voies de signalisations des Cellules Souches Leucémiques	54
III.1.2 La voie PI3K/Akt/mTOR	54
III.1.3 La voie JAK/STAT	58
III.1.5 La voie Hedghehog	60
III.1.1 Protéines du groupe Polycomb (PcG)	62
III.1.7 Les protéines kinase C	68
III.2 Métabolisme énergétique des Cellules Souches Leucémique	es72
III.2.1 La Glycolyse	73
III.2.3 La voie d'oxydation des acides gras ( $\beta$ -oxydation)	75
III.2.4 La glutaminolyse	76
III.2.5 La voie des pentoses phosphates	76
III.2.2 Le métabolisme mitochondrial	77
II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle)	e de Krebs 77
II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle) II.2.2.2 Les cardiolipines	e de Krebs 77 78
II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle) II.2.2.2 Les cardiolipines Objectifs	e de Krebs 77 78 81
<ul> <li>II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle)</li> <li>II.2.2.2 Les cardiolipines</li> <li>Objectifs</li> <li>Objectif 1 : Agir sur la leucémogénèse en ciblant l'Axe BCR-ABL-PK 82</li> </ul>	e de Krebs 77 78 81 81 
<ul> <li>II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle)</li> <li>II.2.2.2 Les cardiolipines</li> <li>Objectifs</li> <li>Objectif 1 : Agir sur la leucémogénèse en ciblant l'Axe BCR-ABL-PK 82</li> <li>A-Présentation de l'étude et résumé</li> </ul>	e de Krebs 77 78 81 81 82
<ul> <li>II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle)</li> <li>II.2.2.2 Les cardiolipines</li> <li>Objectifs</li> <li>Objectif 1 : Agir sur la leucémogénèse en ciblant l'Axe BCR-ABL-PK 82</li> <li>A-Présentation de l'étude et résumé</li> <li>B- Article soumis pour publication Cancers</li> </ul>	e de Krebs 77 78 81 81 82 82 
<ul> <li>II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle)</li> <li>II.2.2.2 Les cardiolipines</li> <li>Objectifs</li> <li>Objectif 1 : Agir sur la leucémogénèse en ciblant l'Axe BCR-ABL-PK 82</li> <li>A-Présentation de l'étude et résumé.</li> <li>B- Article soumis pour publication Cancers</li> <li>C-Conclusion</li> </ul>	e de Krebs 77 78 81 81 82 82 82 
<ul> <li>II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle)</li> <li>II.2.2.2 Les cardiolipines</li> <li>Objectifs</li> <li>Objectif 1 : Agir sur la leucémogénèse en ciblant l'Axe BCR-ABL-PK 82</li> <li>A-Présentation de l'étude et résumé</li> <li>B- Article soumis pour publication Cancers</li> <li>C-Conclusion</li> <li>Objectif 2 : Agir sur la leucémogenèse en utilisant une molécule ider une approche bio-informatique</li> </ul>	e de Krebs 77 78 78 81 81 82 82 83 84 ntifiée par 85
<ul> <li>II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle)</li> <li>II.2.2.2 Les cardiolipines</li></ul>	e de Krebs 77 78 78 81 81 82 83 82 83 84 htifiée par 85 85
<ul> <li>II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle)</li></ul>	e de Krebs 77 78 78 81 Cδ-BMI1. 82 83 83 84 htifiée par 85 85 85
<ul> <li>II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle)</li> <li>II.2.2.2 Les cardiolipines</li> <li>Objectifs</li> <li>Objectif 1 : Agir sur la leucémogénèse en ciblant l'Axe BCR-ABL-PK 82</li> <li>A-Présentation de l'étude et résumé.</li> <li>B- Article soumis pour publication Cancers</li> <li>C-Conclusion</li> <li>Objectif 2 : Agir sur la leucémogenèse en utilisant une molécule ider une approche bio-informatique.</li> <li>A-Présentation de l'étude et résumé.</li> <li>B-Matériels et Méthodes</li> <li>Reagent and antibodies</li> </ul>	e de Krebs 77 78 78 81 81 82 83 82 83 83 85 85 87 87
<ul> <li>II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle)</li> <li>II.2.2.2 Les cardiolipines</li></ul>	e de Krebs 77 78 78 81 81 82 83 83 83 85 85 87 87 87
<ul> <li>II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle (TCA cycle)</li> <li>II.2.2.2 Les cardiolipines</li> <li>Objectifs</li> <li>Objectif 1 : Agir sur la leucémogénèse en ciblant l'Axe BCR-ABL-PK 82</li> <li>A-Présentation de l'étude et résumé</li> <li>B- Article soumis pour publication Cancers</li> <li>C-Conclusion</li> <li>Objectif 2 : Agir sur la leucémogenèse en utilisant une molécule ider une approche bio-informatique</li> <li>A-Présentation de l'étude et résumé</li> <li>B-Matériels et Méthodes</li> <li>Reagent and antibodies</li> <li>Cell lines</li> <li>Proliferation Assay</li> </ul>	e de Krebs 77 78 78 81 82 82 83 82 83 83 85 85 87 87 87 87 

Analysis of Apoptosis88
Primary cells isolation88
Colony Forming Cell (CFC) Assay:88
Long-Term Initiating Cell (LTC-IC) with limiting dilution assays (LDA)88
CFSE assays
Plasmids and transduction89
Western blot
Oxygen consumption measurements89
In-vivo experiments
C-Résultats91
D-Figures et légendes98
Conclusion
Discussion générale
L'axe BCR-ABL/PKCδ/BMI1122
L'alexidine comme traitement anticancéreux :124
Perspectives :
Références

### Liste des abréviations

β-TRCP	Beta-transducin repeats-containing proteins
μ-BCR	micro BCR
A-loop	Activation-loop
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AKT/PKB	Protéine kinase B
ALX	Alexidine
ARC	Absence de Réponse Cytogénétique
ATG	Autophagy related genes
АТР	Adénosine Tri-Phosphate
BAD	BCL2 Associated Agonist of Cell Death
BAX	BCL2 Associated X Protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region-Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
BMI1	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
BOSU	Bosutinib
C-MYC	Cellular Myelocytomatosis Oncogene
СВХ	Chromobox Homolog
CCL3	C-C Motif Chemokine Ligand 3
CCNG2	Cyclin G2
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CL	Cardiolipines
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CSL	Cellule Souche Leucémique
CSL	Cellule Souche Mésenchymateuse
DASA	Dasatinib
DHH	Desert Hedgehog
E2F1	E2F Transcription Factor 1

EZH2	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
FAK	Focal Adhesion Kinase
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
FOXO	Forkhead box protein O
IFN	Interféron
IGFBP3	Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3
ІНН	Indian Hedgehog
IL	Interleukine
IMA	Imatinib
ІТК	Inhibiteur de Tyrosine Kinase
JAK	Janus-family tyrosine kinase
KD	Kinase Domain
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
miR	micro-ARN
МО	Moelle Osseuse
M-BCR	Major BCR
m-BCR	minor BCR
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
МО	Moelle Osseuse
mTOR	mechanistic Target Of Rapamycin
NILO	Nilotinib
OCR	Oxygen Consumption Rate
OXPHOS	Phosphorylation Oxydative
P-loop	Phosphate-binding loop
p14ARF	protein 14kDa alternate reading frame
p16INK4A	protein 16kDa CDK4 Inhibitor
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PcG	Polycomb
Pgp	P-glycoprotein
PI3K-III	Phosphoinositide 3-kinase de classe III
ΡΚCδ	Protéine Kinase C delta

PONA	Ponatinib
PP2A	Protein Phosphatase 2a
PRE	PcG response elements
Ptch1	Patched 1
PTPMT1	Protein Tyrosine Mitochondrial Phosphatase 1
RCM	Réponse Cytogénétique Minime
RCm	Réponse Cytogénétique Partielle
RCM	Réponse Cytogénétique Majeure
RHC	Réponse Hématologique Complète
RCyP	Réponse Cytogénétique Partielle
RCyC	Réponse Cytogénétique Complète
RMM	Réponse Moléculaire Majeure
RMP	Réponse Moléculaire Profonde
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma kinases
RING1	E3 Ubiquitin-Protein Ligase RING1
RMC	Rémission Moléculaire Complète
RPS6	Ribosomal protein S6
RTqPCR	Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction
SALL4	Spalt Like Transcription Factor 4
SH2/SH3	SRC Homology 2/3 Domain
SHC	SH2-contaltining collagen-related proteins
SHH	Sonic Hedgehog
SMD	Syndrômes Myélodysplasiques
Smo	Smoothened
Sp1	Sp1 transcription factor
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SUFU	Suppressor of fused
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
Twist-1	Twist Family BHLH Transcription Factor 1

### Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la progression de la Leucémie Myéloïde Chronique

Figure 2 : Illustration de la translocation chromosomique donnant naissance au chromosome de Philadelphie

Figure 3 : Structure du gène de fusion *BCR-ABL* et des différentes isoformes de la protéine chimérique BCR-ABL

Figure 4 : Schéma des perturbations fonctionnelles induites par l'émergence de BCR-ABL

Figure 5 : Exemple de caryotype avec les chromosomes 9 et 22, formant le chromosome de Philadelphie

Figure 6 : Exemple de FISH détectant la présence de *BCR* (vert), *ABL* (rouge) *et BCR-ABL* (jaune)

Figure 7 : Historique des travaux scientifiques et des traitements dans la Leucémie Myéloïde Chronique

 Table 1 : Tableau récapitulatif des inhibiteurs de tyrosine kinase validés en clinique

 pour traiter la Leucémie Myéloïde Chronique

 Table 2 : Définitions des évolutions sous traitement dans la Leucémie Myéloïde

 Chronique.

Figure 8 : Représentation schématique des régions du domaine kinase de BCR-ABL présentant des mutations ponctuelles

Figure 9 : Co-crystalisation de l'Imatinib et du Ponatinib avec la forme T315I de BCR-ABL

Figure 10 : Heat map des concentrations inhibitrices des ITKs pour des mutants simples ou compound mutants

Figure 11 : Mécanismes de résistance dépendants et indépendants de BCR-ABL des Cellules Leucémiques dans la Leucémie Myéloïde Chronique

Figure 12 : Schéma hiérarchique de l'hématopoïèse

Figure 13 : Les différentes niches des Cellules Souches Leucémiques dans la moelle osseuse normale

Figure 14 : Représentation schématique des différents acteurs clés et fonctions des niches hématopoïétiques

Figure 15 : Composants cellulaires et moléculaires impliqués dans le dialogue avec les Cellules Souches Hématopoïétiques

Figure 16 : Modèle d'interaction entre les adipocytes et les Cellules Souches Leucémiques exprimant CD36 dans la Leucémie Myéloïde Chronique

Figure 17 : Modèle de l'émergence de Cellules Souches Leucémiques dans la Leucémie Myéloïde Chronique

Figure 18 : Vue d'ensemble des différentes classes de PI3Ks

Figure 19 : Illustration des complexes mTORC1 et mTORC2

Figure 20 : La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR

Figure 21 : Schéma de la structure des protéines JAK et STAT

Figure 22 : Voie de signalisation Hedgehog

Figure 23 : Les complexes PRC et leur activité enzymatique

Figure 24 : Structure des PKCs

Figure 25 : Structures de la staurosporine, de la rottlerin et des dérivés de deuxième (KAM1) et de troisième (BJE6-106) génération

Figure 26 : Vue d'ensemble des adaptations métaboliques des cellules cancéreuses

Figure 27 : Biosynthèse et remodelage des cardiolipines

Figure 28 : Schéma récapitulatif des modes d'action du BJE6 et de l'ALX combinées aux ITKs.

 Table 3 : Tableau récapitulatif des molécules identifiées après crible du Connectivity

 Map (Cmap).

### CHAPITRE 1 : LMC Généralités

### I. La Leucémie Myéloïde Chronique

La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est un cancer hématologique rare qui se traduit par une prolifération importante et anarchique de cellules granulocytaires dans la moelle osseuse sans qu'elles ne perdent leur capacité de se différencier (Abramson, Miller et al. 1977). Cette production excessive de granulocytes par la moelle osseuse entraîne leur accumulation ainsi que celle de certains de leurs précurseurs : des cellules blastiques (cellules immatures et non fonctionnelles) dans la moelle osseuse, dans le sang périphérique et partout où le sang circule, ce qui entraîne les symptômes de la pathologie.

### I.1 Epidémiologie

La LMC présente une incidence de 1 à 2 cas pour 100 000 personnes à l'échelle mondiale et elle représente 15 à 20 % des leucémies chez l'adulte en touchant environ 12 000 personnes en France, majoritairement parmi les personnes âgées de plus de 50 ans avec une prédominance masculine discrète. Elle apparait très rarement au niveau pédiatrique et chez les jeunes adultes puisqu'elle ne représente que 3 % des nouveaux cas diagnostiqués de leucémie infantile (https://www.sllcanada.org/leucemie/leucemie-myeloide-chronique/la-lmc-chezles-enfants-et-les-jeunes-adultes). Environ 700 nouveaux cas sont recensés chaque année en France (Association LMC France (Leucémie Myéloïde Chronique France) : https://www.lmcfrance.fr/la-lmc/qu-est-ce-que-la-lmc). A titre d'exemple pour l'année 2018, on estime à 818 le nombre de nouveaux cas de LMC en France métropolitaine dont 480 chez l'homme (Le Guyader-Peyrou S, Defossez G, Dantony E, Mounier M, Cornet E, Uhry Z, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 2 – Hémopathies malignes. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Saint-Maurice (Fra) : Santé publique France, 2019. 169 p) et aux Etats-Unis, pour l'année 2020, on estime à 8450 le nombre de personnes diagnostiquées de LMC avec 4970 hommes et 3480 femmes (Statistics adapted from the American Cancer Society's (ACS) publication, Cancer Facts & Figures 2020, and the ACS website (January 2020) https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-myeloid-cml/statistics).

### I.2 Symptomatologie de la Leucémie Myéloïde Chronique

Le diagnostic de la LMC est généralement posé sans réel symptômes apparent, à la suite d'une prise de sang fortuite liée à un état de fatigue prolongé.

La LMC se traduit par une altération de la fonction des cellules sanguines saines (il y a aussi une anémie et des problèmes de défenses immunitaires) liée à l'accumulation des cellules leucémiques et, à plus long terme, par l'envahissement des organes lymphoïdes secondaires (lieux d'activation des lymphocytes naïfs, et par conséquent point de départ de la réponse immunitaire adaptative) tels que la rate et les ganglions ou d'autres organes comme le foie. L'accumulation des cellules leucémiques dans ces organes perturbe leur fonctionnement.

Un des symptômes les plus fréquents de la LMC est l'anémie. Cette dernière est caractérisée par une diminution du nombre de globules rouges dans le sang, ce qui entraîne de la fatigue et de l'essoufflement. On retrouve ainsi au niveau de l'hémogramme des patients des niveaux d'hémoglobine inférieurs à 10 g/dL chez 15 % d'entre eux avec des niveaux encore plus faibles en cas d'hyperleucocytose (augmentation du nombre de globules blancs). L'hyperleucocytose, plus commune que l'anémie au diagnostic initial, est fortement marquée et associée à une polynucléose neutrophile (augmentation du nombre de neutrophiles). L'examen de la formule leucocytaire révèle une myélémie (présence dans le sang de granulocytes immatures) avec un nombre de leucocytes supérieur à 100 G/L dans 50% des cas et pouvant atteindre des valeurs de l'ordre de 500 G/L. Cette formule leucocytaire, caractéristique, caractéristique de la myélémie est souvent associée à un excès de polynucléaires basophiles, ainsi qu'à une thrombocytose (augmentation du nombre de thrombocytes) auxquels se rajoutent des saignements et des ecchymoses sans causes identifiables. (https://www.vidal.fr/recommandations/4057/leucemie\_myeloide\_chronique/diagnostic/)(http:/ /www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/60-enseignement-de-Ihematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/pathologie-granulocytairesyndromes-myeloproliferatifs/105-leucemie-myeloide-chronique).

Ainsi, on observe régulièrement chez les patients atteints de LMC, dans les phases les plus avancées, une pancytopénie qui correspond à la détection de trois symptômes : l'anémie, la neutropénie (diminution des polynucléaires neutrophiles) et la thrombocytopénie. Les symptômes cliniques les plus marqués comme la splénomégalie, une fatigue chronique intense et généralisée, n'apparaissent que chez les patients à des stades tardifs.

### I.3 Facteurs étiologiques de la Leucémie Myéloïde Chronique

D'une manière générale, les facteurs de risques de la LMC sont peu connus. Les principaux facteurs de risques sont l'âge et le genre masculin, bien que cette prédominance masculine

soit très discrète et demeure inexpliquée à ce jour. Cependant, plusieurs études épidémiologiques ont pu mettre en avant un certain nombre d'autres facteurs pouvant favoriser le développement de la maladie : c'est le cas de l'exposition aux rayonnement ionisants à très hautes doses comme lors d'un accident nucléaire ou encore une exposition au benzène.(Hsu, Preston et al. 2013).

### I.4 Evolution de la Leucémie Myéloïde Chronique

La LMC se décline en 3 phases distinctes : la phase chronique, la phase accélérée et la phase blastique. Ces phases sont basées sur le nombre de cellules blastiques détectées dans la moelle osseuse et dans le sang, mais aussi en fonction de la sévérité des symptômes associés.

La phase chronique est la première phase de la maladie et s'étale sur plusieurs années (3 à 5 ans en moyenne). La plupart des patients sont diagnostiqués à ce stade (environ 85 % d'entre eux) de manière tout à fait fortuite par exemple lors d'une analyse de sang, qui permet d'observer un nombre conséquent de globules blancs, ou d'un examen physique permettant de remarquer une rate anormalement volumineuse. A ce stade de la maladie, la moelle osseuse et le sang contiennent moins de 10 % de blastes et les plaquettes sanguines sont encore à un taux normal. La rate reste capable de compenser la diminution du nombre de cellules sanguines dans la moelle osseuse suite à l'encombrement lié aux blastes, mais cette production accrue de cellules sanguines par la rate va provoquer une augmentation importante de son volume (splénomégalie). Les patients en phase chronique ne ressentent pas ou peu ou de symptômes ; généralement ils ressentent de la fatigue associée à une perte de poids ou des douleurs abdominales. Ces premiers signes qui incitent généralement les patients à consulter conduisent au premier diagnostic. Cette phase représente la plus simple à traiter parce qu'elle est celle où les patients répondent le mieux aux traitements proposés, ce qui permet immédiatement d'empêcher la progression de la maladie. L'objectif thérapeutique actuel reste la stabilisation au long terme de la LMC en phase chronique.

La deuxième phase de la LMC est représentée par la **phase accélérée**. Quand la maladie progresse vers la phase accélérée, on observe une très forte augmentation de nombre de blastes dans la moelle osseuse ce qui perturbe très fortement la production de globules rouges et de plaquettes sanguines. Ainsi, on peut détecter de 10 à 30 % de blastes dans la moelle osseuse ou le sang périphérique. Cette phase est très courte en comparaison de la phase chronique, durant généralement de quelques mois à une année. Les symptômes de la LMC s'aggravent et on commence à observer par exemple une perte d'appétit, une perte de poids ou encore des cas de fièvre ou de sueurs nocturnes. De plus, la perturbation de la formation

des différents constituants du sang (processus appelé hématopoïèse) s'intensifiant à cette étape, on remarque également une augmentation des cas d'anémie (qui diminue très fortement les capacités physiques des patients), de troubles de la coagulation ou encore des infections à répétition (liées à une carence en globules blancs fonctionnels). Le volume de la rate continue d'augmenter, cette dernière contribuant davantage à la production de cellules sanguines. De plus, cette phase correspond à l'émergence de mutations secondaires et de défauts cytogénétiques liés à l'instabilité génomique induite par l'anomalie oncogénétique majeure de la maladie (qui sera développée ultérieurement). Les traitements à ce stade sont moins efficaces que lors de la phase chronique, avec une régression possible de la maladie vers la phase antérieure, mais cette possibilité reste toutefois limitée d'où l'intérêt de pouvoir traiter les patients le plus tôt possible. La plupart des patients (environ 70 %) passent de la phase chronique à la phase accélérée en l'absence de traitements, mais parfois la maladie passe directement de la phase chronique à la phase blastique.

La dernière phase vers laquelle évolue la LMC est la **phase blastique.** A ce stade les blastes représentent plus de 20 % des cellules de la moelle osseuse ou du sang et se répandent massivement via le réseau sanguin dans l'organisme. La prolifération de ces derniers est devenue tellement importante qu'elle supplante l'hématopoïèse normale, réduisant drastiquement la production des globules blancs et des thrombocytes, qui ne peuvent plus remplir leur mission de manière efficace. La survie du patient est ici en danger avec une médiane de survie très faible, de l'ordre de 3 à 6 mois. L'efficacité des traitements à ce stade est considérablement limitée, pouvant quelque peu améliorer la situation, mais une stabilisation de la maladie n'est plus possible sauf éventuellement par une greffe de moelle osseuse. Les symptômes deviennent critiques avec de fortes fièvres, une pancytopénie sévère et des douleurs osseuses. La LMC évolue par la suite dans la moitié des cas en Leucémie Myéloïde Aiguë (définie lorsque les patients présentent plus de 30 % des cas, et plus rarement en Leucémie Lymphoblastique de type T (Wong and Witte 2004). (Figure 1)



**Figure 1 : Schéma de la progression de la Leucémie Myéloïde Chronique** d'après (Losson, Schnekenburger et al. 2020). Dans la Leucémie Myéloïde Chronique, on observe une prolifération excessive de leucocytes immatures et de blastes dans la moelle osseuse et dans la circulation sanguine lorsque la maladie progresse. La première phase de la maladie est la phase dite chronique, asymptomatique en général et qui correspond à un taux de blastes sanguins de 5 %. La deuxième phase de la maladie, la phase accélérée, se développe après plusieurs années sans traitements, correspond à un taux de blastes sanguins compris entre 5 à 20 % ; les patients présentent des symptômes de fatigue intense et de perte d'appétit. Si aucun traitement n'est apporté à ce stade, la maladie progresse en moins d'un an vers la dernière phase, la phase blastique, qui comprend des taux de blastes sanguins très élevés (au-delà de 20 %) associés à une détérioration de l'état général des patients qui peut aboutir à leur décès au bout de quelques mois.

# I.5 Anomalie oncogénique de la Leucémie Myéloïde Chronique : BCR-ABL

Cette hémopathie maligne a pour origine l'émergence d'une anomalie chromosomique au sein de certaines cellules souches/progénitrices de la moelle osseuse : le chromosome de Philadelphie (Ph), du nom de la ville des Etats-Unis où il fut découvert en 1960 par Peter Nowell et David Hungerford (Nowell 1962). Cette découverte fut la première permettant de faire le lien entre une anomalie génétique et un cancer spécifique chez l'Homme. L'histoire de cette découverte est suffisamment remarquable pour mériter que l'on s'y attarde quelques instants :

Peter C. Nowell était un chercheur à l'Université de Pennsylvanie où il étudiait les cellules leucémiques. Il a remarqué par microscopie que ces cellules leucémiques étaient capables de se diviser et de manière surprenante que leurs chromosomes étaient visibles en structures distinctes. N'étant pas familier avec l'étude spécifique des chromosomes, il contacta David A. Hungerford qui était doctorant dans un laboratoire de génétique au Fox Chase Cancer Center et rédigeait sa thèse sur les chromosomes. Ce dernier a pu remarquer par la suite, après des expériences de microscopie que certaines cellules leucémiques présentaient un chromosome 22 anormalement plus court que la normale : ce fut la découverte du chromosome Ph. Un peu plus tard en 1973, Janet D. Rowley de l'Université de Chicago parvint à déterminer le mécanisme à l'origine de la formation de ce chromosome Ph : il s'agissait d'un transfert de matériel génétique entre le chromosome 22 et le chromosome 9, le premier devenant plus court mais favorisant la prolifération cellulaire alors qu'il ne l'impacte pas en temps normal. Ce chromosome 22 plus court, résultant d'une translocation chromosomique (des portions de deux chromosomes échangées) provoque la transformation maligne des cellules et leur confère ainsi une augmentation de leur division cellulaire et un blocage de la réparation des dégâts à l'ADN. (Rowley 1973). Cette translocation chromosomique entre le chromosome 9 via sa région q34 et le chromosome 22 via sa région q11 provoque la fusion des gènes Breakpoint Cluseter Region (BCR) et Abelson murine leukemia (ABL). La protéine de fusion BCR-ABL, codée par le gène BCR-ABL, est porteuse d'une activité kinase constitutivement active et est responsable de la pathogenèse de la LMC. D'autre part, le gène de fusion réciproque ABL-BCR présent au niveau du chromosome 9q+ après la translocation t(9:22)

est transcriptionnellement actif chez environ 2/3 des patients atteints de LMC mais à ce jour il n'a pas été démontré de rôle fonctionnel dans la maladie (Melo 1997). (Figure 2)



# Figure 2 : Illustration de la translocation chromosomique donnant naissance auchromosomedePhiladelphied'après

(https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/bcr-abl-fusion-gene). L'émergence du chromosome de Philadelphie est provoquée par une translocation

chromosomique entre les chromosomes 9 et 22 qui échangent du matériel génétique. Le nouveau chromosome 22 ainsi formé est appelé chromosome de Philadelphie (Ph+).

Toutefois, la fonction des protéines Bcr et ABL demeure très peu étudiée en comparaison de la protéine de fusion BCR-ABL. Il semblerait que la protéine Bcr joue le rôle de navette entre le cytoplasme et des membranes apicales et intracellulaires par le biais d'interactions avec les protéines PDZK1 et AF-6 mais également avec des membranes vésiculaires via Mint3 (Malmberg, Andersson et al. 2004) En ce qui concerne ABL, elle joue également un rôle de navette mais entre le cytoplasme et le noyau : elle peut ainsi fixer l'ADN et l'actine, ce qui lui confèrerait des fonctions biologiques distinctes et variées en fonction du contexte cellulaire (Wang 2014).

A ce jour, les causes de l'apparition du gène de fusion BCR-ABL sont mal connues. Toutefois, on peut supposer que ces réarrangements chromosomiques soient le résultat de recombinaisons génomiques anormales liées à des erreurs de réplication ou à des

évènements moléculaires endogènes et/ou exogènes. En revanche, il apparaît indéniable qu'il s'agit d'une anomalie génétique acquise (en aucun cas héréditaire) présente chez 95 % des patients atteints de LMC (Faderl, Talpaz et al. 1999). Chez environ 5 % des patients présentant des signes cliniques propres à la LMC, on peut noter une absence du chromosome Ph (Kantarjian, Kurzrock et al. 1990, Kantarjian, Deisseroth et al. 1993, Cortes, Talpaz et al. 1996) et la LMC est alors qualifiée d'atypique (LMCa). Dans une LMCa, les cellules leucémiques des patients présentent des translocations chromosomiques plus complexes ou bien un caryotype normal. L'hypothèse la plus vraisemblable à ce jour est que le résultat de ces translocations complexes permet effectivement la juxtaposition de BCR et ABL comme avec la translocation classique t(9;22), mais dans ce cas, la présence du chromosome est masquée par des translocations supplémentaires. Ceci se traduit néanmoins par des symptômes cliniques semblables à ceux de patients présentant le chromosome Ph. Cependant, environ la moitié de ces patients sont en réalité BCR-ABL positifs, puisque la détection est possible par des méthodes de biologie moléculaires (Wiedemann, Karhi et al. 1988) et ces derniers peuvent donc être traités de manière classique. Les vrais patients Ph négatifs sont généralement des sujets plus âgés et présentent plus fréquemment une thrombocytopénie, un faible nombre de globule blancs, une monocytose importante, peu de basophiles et un ratio cellules myéloïdes/cellules érythrocytaires plus faible au niveau de la moelle osseuse.(Martiat, Michaux et al. 1991, Montefusco, Alimena et al. 1992, Cortes, Talpaz et al. 1995). De plus, ces patients peuvent présenter d'autres troubles hématologiques, notamment une leucémie myélomonocytique chronique en plus de la LMCa. (Martiat, Michaux et al. 1991, Costello, Lafage et al. 1995).Les patients atteints de LMCa ont également la particularité de présenter un faible risque de développer une transformation blastique, ce risque étant compris entre 25 et 50 %(Kantarjian, Deisseroth et al. 1993, Cortes, Talpaz et al. 1996), et peuvent être l'objet d'une hyperleucocytose progressive ainsi que d'une organomégalie et une aplasie médullaire (Kurzrock, Kantarjian et al. 1990). Toutefois, leur médiane de survie est significativement plus courte que celle de patients Ph+ (25 vs 70 mois) (Cortes, Talpaz et al. 1995). La seule option de prise en charge thérapeutique efficace de ces patients reste la transplantation de moelle allogénique pour ceux qui y sont éligibles.

Dans 95 % des formes classiques de LMC, la transcription de l'oncogène *BCR-ABL* produit une protéine chimérique de 210 kDa nommée p210. Dans les 5 % des cas restant, des points de cassures se produisent dans des régions alternatives ce qui donne naissance à d'autres isoformes de BCR-ABL que sont les protéines p190 et p230. Par ailleurs, le gène de fusion *BCR-ABL* est retrouvé dans 10 à 20 % des Leucémies Lymphoblastiques de l'adulte, 2 à 5 % de celles de l'enfant et dans de rares cas de Leucémie Aiguë Myéloïde, lymphome, myélome ou encore de Leucémie Neutrophilique Chronique (Westbrook, Hooberman et al. 1992, Melo 1996). (Figure 3)



Figure 3 : Structure du gène de fusion *BCR-ABL* et des différentes isoformes de la protéine chimérique BCR-ABL d'après (Kang, Liu et al. 2016). *a*) *Le gène de fusion BCR-ABL correspond à la fin du 5' du gène BCR (localisé sur le chromosome 22q11) et à la fin du 3' du gène ABL1 (localisé sur le chromosome 9q34). La cassure chromosomique au niveau de BCR a généralement lieu au niveau des introns 13 ou 14(appelé Major breakpoint M-BCR), et plus rarement au niveau de l'intron 1 (appelé minor breakpoint m-BCR) ou de l'exon 19 (appelé \mu breakpoint \mu-BCR). En ce qui concerne le gène ABL1, la cassure chromosomique implique la région entre les exons 1a et 2. <i>b*) La protéine BCR-ABL comprend le domaine Ser/Thr et le domaine Rho/Gef de BCR. Elle comprend également le domaine de localisation nucléaire (NLS), le domaine d'homologie src (SH), et le domaine de liaison à l'actine de ABL1. La cible de l'Imatinib (Gleevec) est le domaine kinase SH1. Les différentes cassures chromosomiques peuvent donner naissance à trois isoformes de BCR-ABL : les formes p230, p210 et p190.

Les points de cassure (breakpoint cluster) au niveau du gène ABL sont regroupés entre les régions 1a et 2 alors qu'il existe beaucoup plus de points de cassure au niveau du gène BCR. Ainsi, les principales régions d'intérêt se situent au niveau du gène ABL :

La région dite M-BCR (Major BCR) qui est la « région de cassure » majeure impliquée dans la LMC. Elle peut produire deux transcrits, e14a2 (b3a2 dans environ 60 % des cas) ou e13a2 (b2a2 dans 35 % des cas). La protéine de fusion résultant de cette cassure est p210 BCR-ABL. La présence de ces deux transcrits peut-être observée chez 5 à 10 % des patients. L'expression de p210 reste à ce jour le marqueur moléculaire de référence de la LMC (Deininger, Goldman et al. 2000).

- La région **m-BCR (minor BCR)** qui est impliquée dans seulement 0,4 % des LMC. Elle produit le transcrit e1a2 qui code pour la protéine p190 BCR-ABL. Cette « région de cassure » singulière est retrouvée dans deux tiers des LAL Ph+ (Pane, Intrieri et al. 2002, Verstovsek, Lin et al. 2002). De plus, dans cette maladie, p190 BCR-ABL possède une activité tyrosine kinase beaucoup plus importante que celle de son homologue p210 qui est due à un niveau de phosphorylation élevé associé à un faible niveau d'auto-inhibition. (Radich, Gehly et al. 1997). De manière intéressante, des études du phosphoprotéome et de l'interactome ont permis de démontrer que, malgré de fortes similarités structurelles et d'activation de kinase, p190 et p210 présentent une diversité propre à chacune, des voies de signalisations engagées ainsi que des partenaires protéiques. Ceci souligne l'hétérogénéité de la signalisation oncogénique intrinsèque de ces deux formes dans un contexte cellulaire défini (Reckel, Hamelin et al. 2017).

- La région **μ-BCR (micro BCR)**, impliquée dans moins de 0,1 % des LMC. Elle permet la formation de l'ARN chimérique e19a2 qui code pour la protéine p230 BCR-ABL.

Les trois isoformes de BCR-ABL, p190, p210 et p230 présentent une structure commune via plusieurs domaines : les domaines SH3, 2, 1 et NLS et le domaine de liaison à l'actine. Toutefois, les formes les plus récurrentes identifiées chez les patients sont les formes p190 et p210. L'émergence de BCR-ABL est nécessaire et suffisante pour établir et maintenir le phénotype de la LMC et va modifier profondément le fonctionnement cellulaire (Daley, Van Etten et al. 1990, Kelliher, McLaughlin et al. 1990) (Figure 4)



Figure 4 : Schéma des perturbations fonctionnelles induites par l'émergence de BCR-ABL d'après (Bavaro, Martelli et al. 2019). L'émergence de BCR-ABL au sein des cellules normales induit des altérations génétiques et cellulaires majeures qui s'accumulent au fur et à mesure de la progression de la maladie vers les phases les plus avancées.

L'activité tyrosine kinase de la protéine ABL est ainsi activée de manière constitutive par sa fusion avec la protéine BCR, ce qui favorise fortement sa dimérisation, voire sa tétramérisation et ainsi ses capacités d'autophosphorylation. Ceci augmente le nombre de résidus phosphotyrosines sur BCR-ABL et par conséquent le nombre de sites de liaison aux domaines SH2 permettant des interactions avec de nombreux partenaires protéiques potentiels (Pendergast, Muller et al. 1991, Pendergast, Quilliam et al. 1993). La localisation cytoplasmique de BCR-ABL lui permet ainsi d'interagir avec une vaste majorité de protéines impliquées dans des voies de signalisations oncogéniques.

La découverte du chromosome Ph a eu deux conséquences majeures. La première a concerné le diagnostic et le suivi thérapeutique de la LMC. La seconde, et non la moins importante, a correspondu à une prise en charge pharmacologique novatrice directement orientée sur l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de cet oncogène. L'efficacité de ce traitement ainsi mis en place, ciblant l'activité enzymatique de BCR-ABL, a de surcroît ouvert la porte au développement d'approches pharmacologiques similaires dans le domaine de la cancérologie, en ciblant un ou plusieurs gènes dont l'expression a pu correspondre à des

protéines porteuses d'activités enzymatiques associées à l'émergence d'autres pathologies cancéreuses. Le développement des thérapies ciblées en cancérologie était né.

### I.6 Critères de diagnostic dans la Leucémie Myéloïde Chronique

La plupart des personnes atteintes de LMC ne présentent pas ou peu de symptômes lorsqu'elles sont diagnostiquées. Ainsi, un des premiers signes permettant d'orienter le diagnostic vers la LMC est souvent une numération anormalement élevée de globules blancs lors d'un examen sanguin, réalisé généralement pour un autre motif. L'établissement du diagnostic d'un patient atteint de LMC comporte plusieurs étapes. En premier lieu, le sang du patient suspecté est analysé en laboratoire par des test d'analyses sanguins : L'hémogramme ou formule sanguine complète permet de quantifier le nombre de thrombocytes, de globules blancs et d'érythrocytes. Ce test permettra éventuellement de confirmer le résultat de la première prise de sang fortuite en associant notamment un taux anormal de thrombocytes associé à un faible taux d'érythrocytes et à un niveau très élevé de globules blancs (myélocytes et neutrophiles). De plus, cet examen des cellules sanguines peut permettre de mettre en évidence (en fonction du stade de la maladie) le passage de cellules immatures appelées promyélocytes de la moelle osseuse dans le sang (myélémie), ces cellules étant normalement absentes dans le sang d'une personne sans LMC. Si la suspicion de LMC persiste, le diagnostic devra être confirmé par un deuxième test qui correspond à un myélogramme consistant à analyser par microscopie les cellules de la moelle osseuse, cette dernière étant prélevée par ponction sternale sous anesthésie locale. Le caryotype des cellules sera également examiné sur ce prélèvement médullaire, permettant d'étudier le nombre et la structure des chromosomes des cellules du patient et donc d'y déceler la présence d'anomalies. Ainsi, le diagnostic de LMC est posé lorsqu'il y a une numération sanguine de globules blancs élevée (avec d'autres caractéristiques citées précédemment), associée à un myélogramme confirmant un envahissement de la moelle osseuse par des blastes leucémiques et lorsque le caryotype révèle la présence du chromosome Ph.



**Figure 5 : Exemple de caryotype avec les chromosomes 9 et 22, formant le chromosome de Philadelphie** adapté d'après (Ai, Liu et al. 2015). *A gauche les chromosomes 9 et 22 sont normaux tandis que ceux à droite représentent les chromosomes anormaux après la translocation chromosomique donnant naissance au chromosome Ph.* 

Cependant, un faible pourcentage de patients présentant les signes de la LMC n'exprime pas de chromosome Ph détectable par les techniques de cytogénétiques standards. Dans ces cas, la mise en évidence de ce chromosome peut être obtenue par d'autres tests comme une technique de cytogénétique moléculaire, la Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) ou bien par la Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).



Figure 6 : Exemple de FISH détectant la présence de *BCR* (vert), *ABL* (rouge) et *BCR*-*ABL* (jaune) d'après (Ai, Liu et al. 2015) Les chromosomes sont ici colorés en bleu par DAPI. Les chromosomes 9 et 22 normaux présentent les versions normales des gènes BCR et ABL alors que les chromosomes 9 et 22 fusionnés révèlent la présence de BCR-ABL par la superposition des signaux rouges et verts (jaune). Le FISH est réalisé ici sur des métaphases et interphases positives (Ph+) ou négative (Ph-) à BCR-ABL. La FISH représente effectivement une technique plus sensible que les tests cytogénétiques classiques pour détecter la présence de *BCR-ABL*. Le principe de cette technique est l'utilisation de sondes fluorescentes capables de se lier à l'Acide Désoxyribonucléique (ADN). L'idée dans ce cas est d'utiliser des sondes capables de détecter les gènes *BCR* et *ABL* chaque sonde étant couplée à un fluorochrome particulier. Ainsi, chaque couleur permet de marquer le chromosome sur lequel se trouve chacun des deux gènes (le 9 ou le 22), et l'oncogène *BCR-ABL* pourra être détecté par la superposition de ces deux couleurs.

La RT-qPCR reste à ce jour la technique **la plus sensible** permettant de mesurer et de quantifier les transcrits BCR-ABL à partir d'échantillons de moelle osseuse ou de sang périphérique. Elle permet de détecter de très faibles quantités du gène *BCR-ABL* (même lorsque le chromosome Ph n'est pas détectable avec les tests cytogénétiques standards ou même le FISH) avec un ratio d'une cellule leucémique pour 10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> cellules normales

Le principe de la RT-qPCR consiste à extraire des acides ribonucléiques (ARN) et à les transformer en ADN complémentaire avec une transcriptase inverse puis à les amplifier par Polymerase Chain Reaction (PCR). De plus, cette technique est utilisée en routine pour un suivi de l'efficacité du traitement et même chez les patients en rémission pour orienter le suivi thérapeutique.

### I.7 Prise en charge thérapeutique de la Leucémie Myéloïde Chronique

Les traitements de la LMC ont considérablement évolué depuis une vingtaine d'années grâce à l'émergence d'inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) ciblant de manière spécifique et efficace BCR-ABL.

### I.7.1 Les traitements de la Leucémie Myéloïde Chronique

I.7.1.1 Historique de la prise en charge de la Leucémie Myéloïde Chronique



- 1 Galton, D. A. G. Myleran In chronic myeloid leukaemia results of treatment. Lancet 264, 208-213 (1953).
- Fishbein, W. N., Carbone, P. P., Freireich, E., Misra, D. & Frei, E. Clinical trials of hydroxyurea in patients with cancer and leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 5, 574–580 (1964).
- Doney, K. et al. Treatment of chronic granulocytic leukemia by chemotherapy, total-body irradiation and allogeneic bone-marrow transplantation. Exp. Hematol 6, 738–747 (1978).
- Talpaz, M., Mccredie, K. B., Mavligit, G. M. & Gutterman, J. U. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. Blood 62, 689–692 (1983)
- 5 Druker, B. J. et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat. Med. 2, 561–566 (1996).
- 5 Shah, N. P. et al. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. Science 305, 399–401 (2004).
- 7 Weisberg, E. et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. Cancer Cell 7, 129–141 (2005).
- Mahon, F. X. et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. Lancet Oncol. 11, 1029–1036 (2010).
- Ross, D. M. et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. Blood 122, 515–522 (2013). 6
- Puttini, M. et al. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. Cancer Res. 66, 11314–11322 (2006) 9
- OHare, T. et al. AP24534, a Pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. Cancer Cell 16, 401–412 (2009). 7
- 12 Hochhaus, A. et al. Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. 376, 917–927 (2017).

# Scientific

- 13 Nowell, P. C. & Hungerford, D. A. Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. J. Natl Cancer Inst. 27, 1013–1035 (1961).
- Rowley, J. D. Letter: a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 243, 290–293 (1973). 4
- 15 Fialkow, P. J. The origin and development of human tumors studied with cell markers. N. Engl. J. Med. 291, 26–35 (1974).
- 16 Heisterkamp, N. et al. Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. Nature 306, 239-242 (1983).
- Udomsakdi, C. et al. Rapid decline of chronic myeloid leukemic cells in long-term culture due to a defect at the leukemic stem cell level. Proc. Natl Acad. Sci. USA 89, 6192–6196 (1992). 17
- Holyoake, T., Jiang, X., Eaves, C. & Eaves, A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. Blood 94, 2056–2064 (1999). 3
- Graham, S. M. et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myelcid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. Blood 99, 319–325 (2002) 19
- Bhatia, R. et al. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. Blood 101, 4701–4707 (2003). 20
- Corbin, A. S. et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. J. Clin. Invest 121, 396–409 (2011). 21
- 22 Hamilton, A. et al. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. Blood 119, 1501–1510 (2012).
- Scott, M. T. et al. Epigenetic reprogramming sensitizes CML stem cells to combined EZH2 and tyrosine kinase inhibition. Cancer Discov. 6, 1248–1257 (2016). 23
- Giustacchini, A. et al. Single-cell transcriptomics uncovers distinct molecular signatures of stem cells in chronic myeloid leukemia. Nat. Med. 23, 692–702 (2017). 25

Kuntz, E. M. et al. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. Nat. Med. 23, 1234–1240 (2017).

24

Figure 7 : Historique des travaux scientifiques et des traitements dans la Leucémie Myéloïde Chronique adapté d'après (Vetrie, Helgason et al. 2020). Les découvertes essentielles concernant les cellules souches leucémiques dans la Leucémie Myéloïde Chronique sont représentées sur cette frise chronologique. En bleu sont annotées les avancées scientifiques et en violet les traitements et observations cliniques. Ab : Antibody ; HSCs : Haematopoietic stem cells ; OXPHOS : oxidative phosphorylation ; Ph : Philadelphia chromosome.

Les premiers traitements de la LMC furent peu documentés mais contemporains aux premières observations de la maladie au 19<sup>ème</sup> siècle. Un des traitements employés à cette époque pour traiter différentes pathologies, dont certains cas de leucémies, fut la solution de Fowler qui contenait de l'arsenic. Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, la radiothérapie splénique fut la première technique palliative utilisée pour la LMC et ce pendant plus d'un demi-siècle. Par la suite, la fin de la Seconde Guerre Mondiale vit le développement de molécules de la famille des agents alkylants qui supplanta l'utilisation de la radiothérapie avec en particulier l'utilisation du busulfan (Galton 1953). Le busulfan (ou 1,4 diméthane-sulfonyl-oxybutane) est la première molécule réellement documentée pour son efficacité dans le traitement de la LMC (1968). En effet, le busulfan fut capable d'atténuer certains symptômes de la maladie et permettait notamment de diminuer le nombre de globules blancs, mais sans toutefois entraîner un arrêt de la progression de la maladie et en provoquant de nombreux effets secondaires très délétères tels que des fibroses pulmonaires, cardiaques ou hépatiques ainsi qu'une myélosuppression sévère (Hehlmann, Heimpel et al. 1993). Quelques années plus tard l'utilisation de l'hydroxyurée (ou hydroxycarbamide), un inhibiteur de la ribonucléotide réductase, a été démontrée induire de meilleurs effets que le busulfan avec notamment un léger gain de survie conféré aux patients, associé à une meilleure tolérance. (Hehlmann, Heimpel et al. 1993). Cependant, tout comme le busulfan, l'hydroxyurée s'est révélée incapable de supprimer l'activité oncogénique du chromosome Ph et par conséquent d'empêcher la progression de la maladie. Dans les années 1980, l'interféron alpha (IFN-α) fut introduit pour le traitement de la LMC. Il a rapidement été démontré qu'il prolongeait de manière significative la durée de vie des patients par rapport à l'hydroxyurée, et ce même si son mécanisme d'action n'était pas très bien caractérisé (1992, Hehlmann, Heimpel et al. 1993). Toutefois, un des problèmes majeurs des traitements avec l'IFN-α correspondait à sa très faible tolérance et aux nombreux effets secondaires qu'il induisait par rapport à l'hydroxyurée ou au busulfan: en effet, 15 à 25 % des patients étaient atteint de symptômes pseudo-grippaux sévères (fièvres, malaises, toux sèches, perte d'appétit, courbatures et nausées), d'anorexie ou encore de dépression nécessitant l'arrêt de ce traitement, et pour 30 à 50 % des autres patients une réduction des doses thérapeutiques a dû être envisagée (1992,

Guilhot, Chastang et al. 1997). C'est dans ces conditions que l'IFN- $\alpha$  est demeuré le traitement le plus efficace pour traiter les patients atteints de LMC en phase chronique jusqu'à l'avènement des ITKs (Kantarjian, Smith et al. 1995).

### I.7.1.2 Traitements actuels de la Leucémie Myéloïde Chronique

L'avènement des ITKs au début des années 2000, avec l'Imatinib développé par la société Novartis, a révolutionné la prise en charge thérapeutique des patients atteints de LMC. Les ITKs sont classés en ITK de 1<sup>ère</sup> (Imatinib) ; 2<sup>ème</sup> (Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib) et 3<sup>ème</sup> génération (Ponatinib).

En effet, l'Imatinib mésylate (Gleevec® ou STI-571) est un inhibiteur compétitif de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) qui bloque l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL en se fixant à son domaine catalytique, ce qui va maintenir BCR-ABL sous forme inactive (Schindler, Bornmann et al. 2000) et aura pour conséquence d'inhiber la prolifération des cellules présentant le chromosome Ph, lesquelles vont mourir par apoptose (Druker, Talpaz et al. 2001, Goldman and Druker 2001, Kantarjian, Sawyers et al. 2002, Kantarjian, Cortes et al. 2003). La première preuve de l'efficacité de l'Imatinib fut décrite en 2003, d'après les résultats de l'étude International Randomized Study of Interferon and STI571 (ou IRIS), en le comparant à un traitement combinant IFN-α et de faibles doses de cytarabine chez des patients en phase chronique (O'Brien, Guilhot et al. 2003). L'utilisation de l'Imatinib, qui représente le premier exemple de thérapie ciblée en oncologie, a profondément bouleversé le pronostic des patients atteints de LMC : il se révèle en effet efficace pour environ 60 % d'entre eux (Hochhaus, O'Brien et al. 2009). Il s'est ainsi rapidement imposé comme le traitement de référence pour la LMC en première intention et plus précisément durant les premières phases de la maladie où les cellules leucémiques sont particulièrement dépendantes de BCR-ABL(O'Dwyer and Druker 2000, Druker, Talpaz et al. 2001). L'Imatinib peux présenter toutefois certains effets secondaires modérés, tels que des problèmes gastrointestinaux (vomissements, nausées et diahrées), des rétentions de liquides ou des crampes musculaires (O'Brien, Guilhot et al. 2003, Druker, Guilhot et al. 2006). Sur le long-terme et avec environ 20 ans d'emploi thérapeutique, il ne lui est pas décrit à ce jour de toxicité majeure (Kalmanti, Saussele et al. 2015). Cependant, au cours du temps et probablement dû au fait de la chronicité du traitement, entre 20 et 30 % des patients finissent par développer des résistances à l'Imatinib qui reflètent de manière générale l'émergence de mutations au sein du domaine kinase de BCR-ABL (Gorre, Mohammed et al. 2001, Shah and Sawyers 2003, Jabbour, Parikh et al. 2011). De plus, certains patients rechutent malgré l'inhibition effective de BCR-ABL, ce qui suggère des mécanismes de résistances alternatifs (Shah and Sawyers 2003) et entre 5 à 10 % des

patients doivent arrêter le traitement parce qu'ils ne le tolèrent pas (Druker, Guilhot et al. 2006). Pour toutes ces raisons, de nombreuses sociétés pharmaceutiques se sont investies dans le développement de nouveaux ITKs tels que le **Nilotinib (Tasigna®)**, le **Dasatinib (Sprycel®)**, le **Bosutinib (Bosulif®)** ainsi que le **Ponatinib (Iclusig ®)**. (Table 1)

Le Nilotinib (ITK de deuxième génération) fut approuvé dès 2007 aux Etats-Unis par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des patients en phase chronique ou accélérée et résistants ou insensibles à l'Imatinib. Le Nilotinib est très proche structurellement de l'Imatinib et provoque une inhibition de BCR-ABL entre 20 et 50 fois plus efficace que ce dernier (Manley, Breitenstein et al. 2004), notamment au niveau de son autophosphorylation au résidu Tyr177, importante pour l'activation des voies PI3K et ERK en aval (Liu and Gray 2006). De manière intéressante, le Nilotinib n'est pas un substrat de la pompe à efflux Pglycoprotein (Pgp) et du transporteur hOCT-1 (Davies, Jordanides et al. 2009). Il s'est révélé être efficace contre la plupart des mutations du domaine kinase de BCR-ABL apparues à la suite d'un traitement avec l'Imatinib à l'exception des mutations F359V, Y253H ou encore E255V/K (Hughes, Saglio et al. 2009). Par ailleurs, son manque d'efficacité contre la mutation gatekeeper T315I tout comme l'Imatinib n'est pas une surprise dans la mesure où leur structure est responsable de leur fixation à proximité de ce résidu, empêchant ainsi leur entrée dans le site catalytique de BCR-ABL (Weisberg, Manley et al. 2005) Dans une moindre mesure, ces deux ITKs inhibent d'autres protéines à activité tyrosine kinase comme PDGF ou les récepteurs c-Kit (Davies, Jordanides et al. 2009).

Le Dasatinib est un ITK de seconde génération qui fut développé pour traiter les patients ne répondant pas à l'Imatinib ou ne pouvant pas tolérer ce dernier. Il a été démontré efficace pour traiter les patients présentant la plus grande majorité des mutations du KD (Kinase Domaine) de BCR-ABL à l'exception de la forme T315I (Muller, Cortes et al. 2009). Cette efficacité s'explique par sa capacité à inhiber la forme inactive mais aussi la forme active du KD de BCR-ABL (Lombardo, Lee et al. 2004, Shah, Tran et al. 2004, O'Hare, Walters et al. 2005, Tokarski, Newitt et al. 2006) et cela lui permet d'être efficace in-vitro contre la plupart des mutations conférant une résistance à l'Imatinib (alors que l'Imatinib ne peut inhiber que la forme inactive du KD de BCR-ABL) (Shah, Tran et al. 2004, O'Hare, Walters et al. 2005, Shah, Skaggs et al. 2007, Redaelli, Piazza et al. 2009). Le Dasatinib est également capable d'inhiber plusieurs protéines tyrosines kinases en plus de BCR-ABL, notamment les protéines de la famille des SRC kinases (Tyrosine-protein kinase LCK) ou c-KIT (Lombardo, Lee et al. 2004, Rix, Hantschel et al. 2007). L'inhibition des kinases SRC confère un avantage conséquent au Dasatinib dans la mesure où les kinases SRC sont impliquées dans certaines résistances

indépendantes de BCR-ABL et dans la progression de la maladie dans un contexte de résistance à l'Imatinib (Li 2008).

Le Bosutinib est un ITK de deuxième génération capable d'inhiber en plus de BCR-ABL platelet-derived growth factor receptor platelet-derived growth factor (PDGFR), c-Kit et les protein kinases de la amille SRC, Src, Lyn et Hck (Puttini, Coluccia et al. 2006, Remsing Rix, Rix et al. 2009, Amsberg and Koschmieder 2013).

Le Ponatinib est le dernier ITK approuvé en clinique à l'heure actuelle pour cibler BCR-ABL. Il est actuellement utilisé en seconde ligne après échec avec un premier ITK ou en première ligne si le patient est diagnostiqué avec une mutation T315I (Cortes, Kantarjian et al. 2012).Toutefois, cet ITK provoque des effets indésirables très délétères telles que des thromboses cardiaques et n'est généralement envisagé qu'en dernier recours. Cette molécule a été fabriquée à partir d'une stratégie dite de structure-based drug design qui a consisté à utiliser la structure protéique de BCR-ABL pour fabriquer une molécule capable d'inhiber à la fois la forme native de BCR-ABL mais également les isoformes portant des mutations responsables des résistances observées en clinique après utilisation d'autres ITKs. Le Ponatinib est ainsi capable de se lier à l'isoforme réfractaire aux autres ITK BCR-ABL T315I par une liaison triple carbone-carbone ce qui permet de minimiser l'encombrement stérique généré par l'isoleucine en position 315 (Huang, Metcalf et al. 2010, Cortes, Kantarjian et al. 2012).

Il convient de s'attarder quelque peu sur un dernier ITK qui représente potentiellement un outil supplémentaire dans l'arsenal thérapeutique pour lutter contre la LMC. En effet, l'Asciminib (ABL001) est un inhibiteur allostérique de BCR-ABL (développé par la société Novartis) qui se fixe au niveau du site myristoyl binding site de BCR-ABL, ce qui lui confère une très haute spécifité d'inhibition envers BCR-ABL (Wylie, Schoepfer et al. 2017). Il est également appelé "allosteric inhibitor that Specifically Targets ABL Myristoyl Pocket" (STAMP). L'originalité du développement de cette molécule est sa capacité à inhiber l'activité de BCR-ABL en se fixant au domaine kinase de BCR-ABL mais sans se lier au site de fixation à l'ATP contrairement aux autres ITKs. Il est actuellement évalué dans un essai clinique de phase I (NCT02081378) où son efficacité est testée chez des patients avec mutation T315I mais réfractaires, intolérants ou inéligibles au Ponatinib. Il est également testé dans une étude de phase II en combinaison avec l'Imatinib chez des patients en phase chronique (NCT03578367). Son efficacité en première ligne thérapeutique, combinée avec nilotinib, imatinib ou dasatinib fait également l'objet d'une étude clinique de phase II (NCT03906292). Par ailleurs, l'Asciminib fait actuellement partie d'un essai clinique de phase III (NCT03106779) qui vise à comparer son

efficacité avec celle du Bosutinib chez des patients atteints de LMC en phase chronique ayant précédemment été traités avec au moins deux autres ITKs.

oiteurs de tyrosine kinase	Traitement de première intention	Thérapie de secondeligne et ultérieure	Dose recommandée	Effets indésirables les plus fréquents (≥ 10 % des patients)	Effets indésirables remarquables
nib (Gleevec)	Oui	N	400 mg/jour	Myélosuppression, fatigue, insomnie, dépression, vertiges, œdémes, prise de poids, infection du tractus respiratoire supérieur, susceptibilité à la grippe, fièvre, toux, douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarrhées, douleurs articulaires, musculaires, démangeaisons, éruptions cutanées, hémorragies gastro-intestinales	
tinib (Sprycel)	Oui	Oui	100 mg/jour	Myélosuppression, fatigue, rétention d'eau, maux de tête, essoufflement, susceptibilité aux infections, douleurs abdominales, nausées, diarrhées, douleurs articulaires, musculaires, démangeaisons, éruptions cutanées, hémorragies gastro-intestinales	Epanchement pleural
inib (Tasigna)	Oui	Oui	Traitement de première ligne : 300 mg 2 fois/jour Patients réfractaires : 400 mg/jour	Myélosuppression, fatigue, maux de tête, nausées, vomissements, diarrhées, constipation, démangeaisons, éruptions cutanées, prurit	Allongement de l'intervalle QT
utinib (Bosulif)	чо N	Oui	500 mg/jour	Myélosuppression, fatigue, maux de tête, toux, fièvre, douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarnées, constipation, augmentation du taux d'alanine et aspartate aminotransférases, douleurs articulaires, démangeaisons, éruptions cutanées	
atinib (Iclusig)	noN	Oui pour patients mutés T315I	45 mg/jour	Myélosuppression, fatigue, maux de tête, hypertension, essoufflement, fièvre, douleurs abdominales, pancréatite, nausées, constipation, augmentation du taux d'alanine aminotransférase, douleurs articulaires, musculaires, démangeaisons, éruptions et sècheresses cutanées	Thrombose artérielle et veineuse Hépatotoxicité, insuffisance hépatique pouvant provoquer la mort

**Table 1 : Tableau récapitulatif des inhibiteurs de tyrosine kinase validés en clinique pour traiter la Leucémie Myéloïde Chronique** d'après (Granatowicz, Piatek et al. 2015). *Les cinq inhibiteurs de tyrosine kinase actuellement utilisés en oncohématologie pour traiter la Leucémie Myéloïde Chronique sont l'Imatinib, le Dasatinib, le Nilotinib, le Bosutinib et le Ponatinib.* 

Le développement des ITKs a ainsi considérablement transformé la prise en charge thérapeutique de la LMC qui est devenue une maladie chronique sous contrôle avec prise en

continue d'un ITK, et cet éventail de 5 ITKs permet aujourd'hui aux cliniciens de pouvoir adapter le traitement des patients en fonction des réponses et de la tolérance aux traitements.

### I.7.1.3 Suivi et adaptation des traitements

Pour comprendre le choix d'une thérapie plutôt qu'une autre il faut tenir compte d'un certain nombre de paramètres qui ont été retenus au cours du temps par les cliniciens afin de proposer la thérapie la plus appropriée.

Les traitements vont être adaptés par les médecins en fonction de la tolérance et des différentes comorbidités, et cette adaptation s'appuie en Europe sur les recommandations de l'European Leukemia Net (ELN), un consortium européen financé par des fonds publics dont l'objectif est de mettre en relation les différents groupes de recherches menant des essais cliniques sur les leucémies en général et des partenaires industriels pour permettre une meilleure prise en charge de la maladie et à terme sa guérison définitive. Ainsi, les différentes caractéristiques biologiques, cliniques et moléculaires permettent d'établir plusieurs critères de réponse au traitement et de définir différents taux de réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires (Table 1).

#### Abréviation

#### Définition

RHC	Réponse Hématologique Complète (numération normale sans splénomégalie)
ARC	Absence de Réponse Cytogénétique (présence du chromosome Ph dans plus de 95 % des mitoses analysées)
RCM	Réponse Cytogénétique Minime (présence du chromosome Ph dans 65 à 95 % des mitoses analysées)
RCm	Réponse Cytogénétique Mineure (présence du chromosome Ph dans 35 à 65 % des mitoses analysées)
RCyP	Réponse Cytogénétique Partielle (présence du chromosome Ph dans 1 à 35 % des mitoses analysées)
RCyC	Réponse Cytogénétique Complète (caryotype normal)
RCM	Réponse Cytogénétique Majeure (somme des RCyP et RCyC)
RMM	Réponse Moléculaire Majeure (taux de transcrits BCR-ABL < 0.1 %) diminution d'au moins 3 logarithmes décimaux sur une période donnée
RMP	Réponse Moléculaire Profonde (taux de transcrits BCR-ABL < 0.01 %) diminution de 4 à 5 logarithmes décimaux, transcrits indétectables par RT-qPCR

 Table 2 : Définitions des évolutions sous traitement dans la Leucémie Myéloïde

 Chronique.
Les différents taux de réponse cytogénétiques (en bleu) et moléculaires (en vert) sont représentés dans la table ci-dessus. La réponse hématologique complète correspond à une absence de tout symptôme et signes cliniques de la maladie (orange).

# I.7.1.4 Facteurs pronostics de la Leucémie Myéloïde Chronique

Le pronostic des patients atteints de LMC dépend de différents facteurs. Toutefois, la réponse primaire aux ITKs reste parmi les facteurs les plus déterminants pour envisager un pronostic favorable à long terme. Ceci concerne les patients qui présentent déjà un bon taux de réponse entre 3 et 6 mois environ après la prise d'un ITK. Pour les patients qui ne répondent pas aux traitements de première intention un nouveau choix thérapeutique sera proposé via l'utilisation d'un autre ITK ou bien d'une transplantation allogénique de CSH lorsque cela est possible. L'introduction d'un deuxième ITK à ce stade peut représenter un avantage considérable dans l'amélioration du taux de réponse et ceci peut se traduire par un bon pronostic à long terme. A ce jour, il existe plusieurs scores qui permettent d'établir le pronostic initial du patient. Ces scores sont calculés avant le début de chaque traitement (dès le diagnostic) et comportent plusieurs critères qui permettent de définir des risques relatifs : faible, intermédiaire ou élevé.

Les principaux scores existants pour poser le pronostic initial des patients à l'heure actuelle sont les scores SOKAL, EURO (Hasford) et EUTOS (Sokal, Cox et al. 1984, Hasford, Pfirrmann et al. 1998, Hasford, Baccarani et al. 2011). Ces scores prennent en compte plusieurs critères avec des facteurs communs tels que l'âge du patient, le volume splénique ou encore le pourcentage de blastes sanguins mais surtout ils permettent d'évaluer des différences de survie (Sokal, Cox et al. 1984, Hasford, Pfirrmann et al. 1998) ou de réponses aux traitements (Hasford, Baccarani et al. 2011). Le Sokal fut pendant longtemps le score le plus utilisé notamment pour les essais cliniques impliquant les ITKs (Sokal, Cox et al. 1984). L'évolution des solutions thérapeutiques dans la LMC fait que la plupart des patients ne meurent plus de la maladie mais d'autres causes ce qui a nécessité le développement d'un 4<sup>ème</sup> score, le score EUTOS Long Term Survival (ELTS) (Pfirrmann, Baccarani et al. 2016, Geelen, Sandin et al. 2018) pour évaluer la probabilité de décéder de la LMC. Ce score utilise les mêmes critères que le score SOKAL mais est basé sur les patients traités aux ITKs. Ainsi, la différence majeure entre ces deux scores est la valeur négative de l'âge du patient dans le pronostic parce que ce dernier a beaucoup moins d'impact chez les patients traités aux ITKs.

# I.7.1.5 Traitements de la Leucémie Myéloïde Chronique réfractaire ou récidivante

Malgré tout l'arsenal thérapeutique à disposition dans le traitement de la LMC, certains patients présentent une LMC réfractaire c'est-à-dire qu'ils ne répondent à aucun des ITKs y compris ceux de dernière génération. Dans d'autres cas il s'agit d'une perte de réponse à un ou plusieurs ITKs donnés et dans ces cas-là il s'agit de LMC récidivantes. Les patients en LMC récidivante peuvent bénéficier d'un traitement par un autre ITK après l'échec d'une première ligne thérapeutique par exemple. Pour ces patients en LMC réfractaire ou récidivante, le seul traitement curatif connu à ce jour reste la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allogreffe). Toutefois, cette solution s'avère très limitée puisque son emploi est restreint d'une part par l'âge du patient (sachant que la LMC à une médiane de 64 ans) et d'autre part par la disponibilité des donneurs. Ainsi, seulement 20 % des patients atteints de LMC peuvent être éligibles à une transplantation.

# CHAPITRE 2 : Résistances dans la LMC

### II. Les différents mécanismes de résistance aux Inhibiteurs de Tyrosine Kinase dans la Leucémie Myéloïde Chronique

L'activité oncogénique de BCR-ABL génère de nombreux bouleversements cellulaires et moléculaires qui s'accumulent au fur et à mesure de la progression de la maladie, de la phase chronique vers la phase blastique, dont certains vont contribuer à rendre les traitements moins efficaces. Par ailleurs, il est intéressant de noter que certains patients peuvent se révéler d'emblée insensible au traitement donné en première intention nécessitant ainsi une prise en charge différente. La notion de résistance dans ce contexte est discutable et l'on préfèrera décrire les patients comme répondeur ou non-répondeur à un traitement donné. Néanmoins, on peut estimer que cela représente une certaine forme de résistance qui peut être contournée en ciblant d'autres voies de signalisation à l'aide d'un autre ITK. Dans tous les cas, d'un point de vue clinique, les patients résistants sont dits primaires lorsqu'ils ne répondent pas aux ITKs selon les réponses espérées dès le départ et sont dits résistants secondaires lorsqu'ils présentent une réponse initiale convenable avec une perte de cette réponse ou la nécessité d'un changement de traitement après utilisation de l'Imatinib en première ligne (Baccarani, Saglio et al. 2006). Plusieurs mécanismes de résistances aux ITKs ont été décrits à ce jour dans la LMC et ces derniers sont catégorisés en fonction de leur dépendance ou de leur indépendance à BCR-ABL.

#### II.1 Les résistances dépendantes de BCR-ABL

#### II.1.1 Mutations dans le domaine kinase ABL

Le mécanisme de résistance aux ITKs le plus fréquent (entre 30 et 90 % des patients qui développent une résistance) correspond à l'émergence de mutations ponctuelles dans la séquence codant pour l'oncogène BCR-ABL (Gorre, Mohammed et al. 2001, Branford, Rudzki et al. 2002, Hochhaus, Kreil et al. 2002, Branford, Rudzki et al. 2003, Gambacorti-Passerini, Gunby et al. 2003, Soverini, Martinelli et al. 2005). Elles peuvent survenir à n'importe quelle phase de la maladie et induisent la substitution d'un seul acide aminé dans le domaine kinase (DK), représentant souvent des résidus essentiels pour le contact direct entre l'ITK et BCR-ABL générant ainsi une diminution très forte de l'affinité de fixation de l'ITK. Ces mutations altérant le DK de BCR-ABL engendrent ainsi une perte d'efficacité des ITKs au cours du temps (Quintas-Cardama and Cortes 2009). A ce jour, il a été identifié une centaine de mutations ponctuelles au niveau de 57 résidus différents du domaine kinase de ABL (Melo and Chuah 2007). Ces mutations émergent majoritairement dans 4 régions du DK : le site catalytique, le

site de fixation de l'ITK, l'activation loop (A-loop) et l'adénosine triphosphate (ATP)-binding loop (P-loop) (Figure X).

Parmis ces mutations, les plus fréquentes (entre 30 et 40 %) se produisent au niveau de la Ploop (Branford, Rudzki et al. 2003), sont associées à un mauvais pronostic et se développent majoritairement durant les phases accélérées ou blastiques (Branford, Rudzki et al. 2003, Soverini, Martinelli et al. 2005).



**Figure 8 : Représentation schématique des régions du domaine kinase de BCR-ABL présentant des mutations ponctuelles** d'après (Jones, Kamel-Reid et al. 2009). Les triangles colorés indiquent les localisations connues des mutations dans le domaine kinase de BCR-ABL à partir d'échantillons de patients résistants aux ITKs (en noir pour l'Imatinib, en vert pour Nilotinib/Imatinib, en bleu pour Dasatinib/Imatinib et en rouge pour les trois ITKs). Les sous-domaines du domaine kinase de BCR-ABL, les exons et la numérotation des acides aminés sont annotés. P-loop : Phosphate binding loop ; IM binding site : Imatinib binding region ; C-loop : Kinase catalytic domain ; A-loop : Activation loop.

Les mutations de BCR-ABL ont été rapportées la première fois dès le début des années 2000 avec notamment l'identification de la mutation T315I dite « gatekeeper » chez des patients dont l'activité de BCR-ABL fut restaurée malgré un traitement chronique par Imatinib qui était efficace jusqu'à cet instant (Gorre, Mohammed et al. 2001). Dans ce cas, la substitution d'une thréonine par une isoleucine à la position 315 provoque l'élimination d'un résidu d'oxygène indispensable pour former un pont hydrogène entre l'Imatinib et le domaine kinase, empêchant également la fixation de la plupart des ITKs à BCR-ABL à cause de l'encombrement stérique généré. Seul le Ponatinib est capable de contourner la résistance due à cette mutation parce qu'il se fixe à BCR-ABL avec un triple bond carbone-carbone (lien éthynyl) entre les groupes

méthylphényl et purines, ce qui permet ainsi d'ignorer l'encombrement stérique généré par l'isoleucine (O'Hare, Shakespeare et al. 2009) (Figure 9). Cette mutation représente environ 15 % des mutations identifiées chez les patients résistants à l'Imatinib mais correspond au mécanisme de résistance acquise à de multiples ITKs le plus courant (Shah, Skaggs et al. 2007).



Figure 9 : Modélisation structurale de l'Imatinib et du Ponatinib avec la forme T315I de BCR-ABL d'après (O'Hare, Shakespeare et al. 2009). *A) Structure cristallisée du Ponatinib (AP24534) sous forme de complexe avec la forme mutante T315I de BCR-ABL. Le Ponatinib est représenté en vert. La chaîne latérale du résidu isoleucine en position 315 (mutation gatekeeper) est représentée en rouge. Les chaînes latérales des résidus Y253 et E255, mutations ponctuelles apparaissant dans le crible cellulaire pour identifier le Ponatinib, sont représentées en gris. B) Interactions clés du Ponatinib avec ABL T315I au niveau du site de fixation de l'ATP. Les ponts hydrogènes sont représentées par les pointillés roses. (C) et (D)* 

# Superposition de l'Imatinib et du Ponatinib montrant l'effet de la mutation T315I sur leur fixation sur ABL. $\alpha$ C : C-helix. ; P-loop : Phosphate binding loop.

De manière intéressante, il semblerait que les cellules exprimant des mutations ponctuelles de BCR-ABL soient préexistantes et n'acquièrent aucun avantage en termes de survie avant d'être exposées aux ITKs. (Roche-Lestienne, Soenen-Cornu et al. 2002). Un argument supplémentaire allant dans cette même direction est l'absence de différence du statut mutationnel des patients qui rechutent (Hochhaus, Kreil et al. 2002). Toutefois, il est impossible à l'heure actuelle de déterminer si ces mutations sont la conséquence de l'instabilité génomique liée à la progression de la maladie et à l'activité de plus en plus soutenue de BCR-ABL ou elles sont effectivement directement responsables de la progression (Khorashad, Anand et al. 2006). En tout cas, les mutations du DK de BCR-ABL ne conduisent pas systématiquement à des rechutes, suggérant l'implication de facteurs supplémentaires pour faire émerger un phénotype réellement résistant (Willis, Lange et al. 2005).

En plus de ces mutations ponctuelles dans le DK de ABL affectant la sensibilité aux ITKs, il existe des mutations dites « compound mutations », définies par 2 ou plusieurs mutations au sein de la même molécule BCR-ABL, en opposition aux mutations polyclonales qui représentent différents clones de mutants BCR-ABL. Ces dernières sont plus rares que les mutations ponctuelles mais confèrent un très haut niveau de résistance aux ITKs et sont naturellement associées à un très mauvais pronostic (Shah, Skaggs et al. 2007, O'Hare, Shakespeare et al. 2009, O'Hare, Zabriskie et al. 2012, Parker, Ho et al. 2012, Khorashad, Kelley et al. 2013, Zabriskie, Eide et al. 2014, Jabbour, Kantarjian et al. 2015). L'hypothèse actuellement retenue pour expliquer l'émergence de ces compound mutations serait que les protocoles cliniques actuels qui utilisent de manière séquentielle plusieurs ITKs, favoriseraient la sélection de clones présentant de multiples résistances (Shah, Skaggs et al. 2007, Khorashad, Kelley et al. 2013, Ai and Tiu 2014).

L'équipe de O'Hare T a inventorié en 2014 les compound mutations de BCR-ABL décrites en clinique et a établi *in vitro* les différents profils de sensibilités aux ITKs de ces mutants. (Zabriskie, Eide et al. 2014) (Figure 10).



Figure 10 : Heat map des concentrations inhibitrices des ITKs pour des mutants simples ou compound mutants adapté d'après (Zabriskie, Eide et al. 2014). Les sensibilités relatives de chaque mutant pour un ITK donné sont représentées selon un gradient de couleur du vert (sensible) au jaune (modérément résistant) à rouge (hautement résistant).

Il est intéressant de noter que la plupart des mutations qui confèrent une résistance au Ponatinib sont des doubles mutations résultant d'associations entre la forme T315I et d'autres formes qui de manière isolée sont très sensibles à cet ITK.

De manière très intéressante, la combinaison de l'Asciminib et du Ponatinib, alors que leur utilisation individuelle ne présente aucune efficacité sur les doubles compounds mutations comprenant au moins la forme T315I, permet d'inhiber efficacement la forme T315I/ Y253H qui est une compound mutations les plus réfractaires tout ITK confondu. Les travaux de l'équipe de Christopher A. Eide suggèrent d'après leur modélisation structurale que la fixation du Ponatinib à ce mutant facilite celle de l'Asciminib qui en retour stabilise davantage la liaison du Ponatinib (Eide, Zabriskie et al. 2019). La combinaison du Ponatinib et de l'ABT-262, un inhibiteur de Bcl-2, permet de resensibiliser les patients à cet ITK malgré l'émergence de compounds mutations (E225G/T315I et F359C/ T315I après utilisation individuelle du Ponatinib (Korfi, Mandal et al. 2015).

#### II.1.2 Amplification de BCR-ABL

L'augmentation de l'expression de BCR-ABL, que ce soit via l'amplification de son gène ou la duplication du chromosome Ph a pu être observée chez des patients mais son implication dans la résistance aux ITKs est moins fréquente que dans les cas de mutations du domaine KD de BCR-ABL. En effet, on estime qu'environ 10 % des résistances à l'Imatinib sont liées à l'acquisition d'un second chromosome Ph ou à l'amplification du gène *BCR-ABL*, permettant ainsi une augmentation de l'expression de la protéine chimérique associée à une activité tyrosine kinase accrue (Mahon, Deininger et al. 2000, Gorre, Mohammed et al. 2001). De plus, des niveaux élevés d'expression de BCR-ABL sont davantage associés à des patients en phase accélérée et sont suspectés de favoriser l'émergence de résistances au niveau du domaine KD de BCR-ABL (Barnes, Palaiologou et al. 2005). De manière intéressante, on peut supposer qu'effectivement des niveaux élevés de BCR-ABL peuvent contribuer à maintenir une activité tyrosine kinase oncogénique suffisante pour permettre aux cellules leucémiques de survivre malgré la présence continue d'ITKs, et permettre leur adaptation à plus long terme via une mutation du domaine KD de BCR-ABL.

#### II.2 Les résistances indépendantes de BCR-ABL

#### II.2.1 Biodisponibilité de l'inhibiteur de tyrosine kinase

Les ITKs utilisés pour traiter la LMC doivent franchir la barrière hépatique où ils sont métabolisés par le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), une des enzymes principales impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Ainsi, une augmentation de l'activité de CYP3A4 peut contribuer fortement à une résistance aux ITKs. En effet, l'Imatinib, le Nilotinib et le Dasatinib sont capables d'inhiber plusieurs transporteurs de molécules et d'autres enzymes, ce qui peut impacter fortement leur biodisponibilité et leur métabolisation (Haouala, Widmer et al. 2011). C'est par exemple le cas de patients traités simultanément avec du Dasatinib et des inhibiteurs de la pompe à proton ou antihistaminiques H2 (problèmes d'estomac, ulcères...etc), ce qui diminue fortement la biodisponibilité du Dasatinib qui n'est pas très soluble à un pH supérieur à 4 : ces patients doivent ainsi prendre des antiacides 2 heures avant ou après l'utilisation de Dasatinib pour ne pas affecter drastiquement son efficacité (Eley, Luo et al. 2009, Takahashi, Miura et al. 2012).

Une fois que les ITKs ont franchi les différentes barrières physiologiques, ces derniers se retrouvent dans la circulation sanguine. Ainsi, l'Imatinib se lie au niveau plasmatique à

différentes protéines, notamment l'albumine et la α1-glycoprotéine (Gambacorti-Passerini, Gunby et al. 2003). La fixation de l'Imatinib à cette dernière, essentielle pour son transport à travers l'organisme, peut représenter un mécanisme important de résistance à cet ITK lorsque son niveau d'expression est élevé, l'Imatinib se retrouvant séquestré au niveau du plasma et donc à distance de ses sites d'actions (Gambacorti-Passerini, Barni et al. 2000). Ainsi, le taux plasmatique de l'ITK, par exemple de l'Imatinib, est corrélé en clinique à la réponse moléculaire et cytogénétique (Picard, Titier et al. 2007).

### II.2.2 Transporteurs d'efflux

Plusieurs études ont pu démontrer l'importance des transporteurs d'efflux dans le maintien des niveaux intracellulaires d'ITKs. Ces transporteurs ont pour rôle principal de contrôler l'absorption de diverses molécules comme les xénobiotiques via l'excrétion de ces derniers selon des processus ATP-dépendants. Leur rôle est fondamental en cancérologie parce qu'ils contrôlent directement l'efflux de molécules pharmacologiques. Dans la LMC, la P-glycoprotein (P-gP, MDR1-Multi Drug Resistance ou ABCB1) et BCRP (breast cancer related protein, ABCG2) sont impliquées dans l'efflux de l'Imatinib (Thomas, Wang et al. 2004). La surexpression de P-gP est par exemple associée à une augmentation de l'efflux de l'Imatinib, notamment après traitement par cet ITK ce qui représente une adaptation de la cellule leucémique au traitement (Illmer, Schaich et al. 2004). Le transporteur d'efflux multidrug resistance protein 3 (ABCC3) présente également l'Imatinib comme substrat et ses niveaux d'ARNm au diagnostic sont corrélés à un pronostic défavorable de réponse à l'Imatinib (Giannoudis, Davies et al. 2014). De plus, son expression est élevée chez des patients en phase de crise blastique (Radich, Dai et al. 2006).

#### **II.2.3 Transporteurs d'influx**

A l'inverse des transporteurs d'efflux, le rôle des transporteurs d'influx est de de contrôler l'entrée de nutriments, de métabolites ou encore de xénobiotiques dans les cellules. Ces deux types de transporteurs sont conjointement responsables de la quantité intracellulaire d'une molécule donnée.

Des modifications de l'expression de ces transporteurs d'influx ont été démontré pour jouer un rôle fondamental dans la capacité d'un ITK à atteindre puis à être séquestré au sein des cellules leucémiques (Crossman, Druker et al. 2005, White, Saunders et al. 2006). Un des

transporteurs les plus importants associés au transport actif de l'Imatinib est la pompe à influx organic-cation transporter-1 (OCT-1 ou SLC22A1), qui contrôle son entrée dans la cellule et donc détermine la quantité intracellulaire disponible de ce dernier (Thomas, Wang et al. 2004). L'importance de la fonctionnalité de ce transporteur est considérable pour établir le pronostic à court terme ou à long terme des patients atteints de LMC (White, Saunders et al. 2007, White, Dang et al. 2010). Il a ainsi été démontré que les niveaux d'ARNm d'OCT1 seraient prédictifs de la réponse des patients, les niveaux d'expressions élevés étant corrélés avec une meilleure réponse à l'Imatinib. (Crossman, Druker et al. 2005, Marin, Bazeos et al. 2010, Nardinelli, Sanabani et al. 2012, Zhong, Meng et al. 2012, Gromicho, Magalhaes et al. 2013). Toutefois, le transporteur OCT-1 est restreint à l'Imatinib et ne régule pas la quantité intracellulaire des autres ITKs tels que le Nilotinib, le Dasatinib ou encore le Ponatinib (White, Saunders et al. 2006, Hiwase, Saunders et al. 2008, Lu, Saunders et al. 2015). De la même manière, il existe également d'autres transporteurs de la famille ATP-binding cassette (ABC) tels que ABCB1 ou ABCG2 qui ont été décrits pour être impliqués dans la résistance aux ITKs mais l'évaluation de leur niveau d'expression chez les patients ne fait pas partie actuellement des protocoles cliniques (Apperley 2007, Dulucq, Bouchet et al. 2008, Milojkovic and Apperley 2009, Ni, Li et al. 2011, Sen, Natarajan et al. 2012, Agrawal, Hanfstein et al. 2014, Eadie, Hughes et al. 2014, Giannoudis, Davies et al. 2014, Lu, Saunders et al. 2015, Eadie, Dang et al. 2017).

La biodisponibilité des ITKs et l'influence des transporteurs d'efflux et d'influx sur leur pharmacocinétique ne constituent pas le seul aspect dans les mécanismes de résistances aux ITKs indépendant de BCR-ABL (Figure 11).



**Figure 11 : Mécanismes de résistance dépendants et indépendants de BCR-ABL des Cellules Leucémiques dans la Leucémie Myéloïde Chronique** d'après (Hamad, Sahli et al. 2013) Les mécanismes de résistances dépendants de BCR-ABL comprennent la duplication ou l'amplification de BCR-ABL qui conduit à une augmentation de l'activité kinase via ABL (1) ou des mutations au niveau de BCR-ABL qui affectent la fixation des ITKs (2). Les mécanismes de résistances indépendants de BCR-ABL comprennent notamment la concentration plasmatique de l'ITK (3), la séquestration de l'ITK dans le plasma par le serum protein acid glycoprotein (AGP), modifiant sa capacité de fixation (4), une augmentation de l'expression de la P-glycoprotein (Pgp), un transporteur d'efflux (5) une diminution de l'expression du transporteur d'influx hOCT1, un transporteur d'influx (6). D'autres mécanismes jouent un rôle dans la résistance aux ITK et dans la progression de la Leucémie Myéloïde Chronique incluant des voies de signalisations alternatives (7).

En effet, il est désormais clairement établi que les CSLs et leur microenvironnement cellulaire jouent un rôle central dans la résistance aux ITKs : ils représentent le mécanisme de résistance indépendant de BCR-ABL le plus étudié à l'heure actuelle. Je développerai dans la suite de ce chapitre les facteurs extrinsèques (le microenvironnement des CSLs) influençant le dialogue avec les CSLs et leur régulation, et je consacrerai le chapitre suivant **(Chapitre 3)** aux CSLs elles-mêmes et en particulier à leurs voies intrinsèques de régulations.

### II.2.1 La niche hématopoïétique

L'étude de la niche hématopoïétique, des différents types cellulaires qui la composent et des mécanismes moléculaires qui contrôlent la fonctionnalité des CSHs et de leurs progéniteurs a considérablement progressé ces dernières années. La contribution de chacun des acteurs de la niche fait toujours l'objet de nombreux travaux, et la niche hématopoïétique autrefois considérée comme d'un seul tenant, est désormais nuancée en plusieurs « sous-niches » qui comprennent des populations cellulaires distinctes et influencent le destin des CSHs via le contrôle de leur quiescence, auto-renouvellement, ou expansion.

# II.2.1.1 Généralités

La niche hématopoïétique est formée par l'ensemble des cellules hématopoïétiques (CSHs, cellules progénitrices et cellules différenciées) associées à des cellules stromales (telles que des adipocytes, des ostéoblastes, des cellules endostéales, des cellules sinusoïdales endothéliales et des cellules stromales mésenchymateuses (CSM)) et à des composantes cellulaires neurales (fibres nerveuses sympathiques et cellules de Schwann non-myélinisées) (Kiel and Morrison 2008, Frenette, Pinho et al. 2013). Elle se situe dans la MO hématopoïétique c'est-à-dire plus précisément au niveau des os plats, des côtes, du sternum, des os iliaques, des vertèbres et des épiphyses des os longs.



**Figure 12 : Schéma hiérarchique de l'hématopoïèse** d'après (Cedar and Bergman 2011). La cellule souche hématopoïétique (HSC) se différencie par étapes successives. Au fur et à mesure du processus de différenciation, les cellules progénitrices empruntent une voie spécifique du système hématopoïétique et de ce fait perdent leur potentiel de différenciation en précurseurs d'autres voies. La différenciation aboutit finalement à la production de cellules matures et fonctionnelles de lignée myéloïde ou lymphoïde. CLP : common lymphoid progenitor ; CMP : common myeloid progenitor ; EP : erythrocyte progenitor ; GMP : granulocyte-macrophage progenitor ; MacP : macrophage progenitor ; MEP : megakaryocyte erythrocyte progenitor ; NK : natural killer.

La MO est le siège de l'hématopoïèse, qui permet la formation de l'ensemble des cellules sanguines à partir des différentes cellules progénitrices des lignés lymphoïdes et myéloïdes. Au sommet de cette hiérarchie se trouvent les CSHs. Ces cellules souches multipotentes sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation pour produire les progéniteurs à l'origine de cellules sanguines matures et fonctionnelles (Laurenti and Gottgens 2018). Les CSHs se différencient ainsi en Multi-Potent Progenitor (MPP) qui donnent naissance aux progéniteurs spécifiques à la ligné myéloïde et lymphoïde, les Common Myeloid Progenitor (CMP) et Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor (LMPP). Ces derniers se différencient en précurseurs plus tardifs qui aboutissent à la formation d'un système sanguin complet qui se renouvelle très rapidement et de manière continue, à hauteur de plus de 450x10<sup>9</sup> de cellules par jours (Fliedner, Graessle et al. 2002).

Le concept de niche hématopoïétique a émergé pour la première fois en 1978 et fut proposé par R. Schofield. La niche hématopoïétique est ainsi définie, d'un point de vue fonctionnel et anatomique, comme étant l'ensemble « spatio-anatomico-cellulo-temporel » contrôlant l'auto-renouvellement et la différenciation des CSHs. La niche hématopoïétique peut être ainsi sous-divisée en deux types de niches (Ghobrial, Detappe et al. 2018) (Figure 13) :

- Les **niches endostéales/ostéoblastiques** qui se trouvent à proximité des os dans un environnement hypoxique (Calvi, Adams et al. 2003) constitueraient le site de nichage des CSHs. En effet, les CSHs s'y trouvent à l'état quiescent et sont également capables de s'y auto-renouveller (Papayannopoulou and Scadden 2008, Yu and Scadden 2016)
- Les niches dites vasculaires/périvasculaires/mésenchymateuses, situées au contact des vaisseaux sanguins (Kiel, Yilmaz et al. 2005) reçoivent ainsi un apport d'oxygène plus conséquent dont l'influence favoriserait la prolifération et la différenciation des CSHs (Kopp, Avecilla et al. 2005).

Ces deux niches agissent ainsi de concert pour maintenir l'homéostasie hématopoïétique via le contrôle fonctionnel des CSHs.



Figure 13 : Les différentes niches des Cellules Souches Leucémiques dans la moelle osseuse normale d'après (Ghobrial, Detappe et al. 2018). L'autorenouvellement et la quiescence des cellules souches leucémiques et de leurs progéniteurs (HSPCs) est contrôlée par le microenvironnement de la moelle osseuse, qui comprend différentes niches. La niche dite vasculaire favorise la maintenance des HSPCs via leur autorenouvellement et leur différenciation en différentes cellules progénitrices. La niche réticulaire contrôle la production de facteurs de croissance et la niche endostéale régule la taille du stock de HSPCs en promouvant leur quiescence et leur stockage à long terme dans la moelle osseuse. Des

dysfonctionnements du microenvironnement de ces niches peut contribuer à l'émergence d'une hématopoïèse anormale. CXCL12 : CXC-chemokine ligand 12.

La compréhension et l'état des connaissances sur la niche hématopoïétique se sont considérablement enrichis depuis son origine dans la mesure où le développement des méthodes d'imagerie, des outils génétiques et l'identification dans une certaine mesure de marqueurs de surfaces spécifiques aux CSHs et aux différents acteurs de la niche permettent désormais d'apprécier la complexité des interactions ces différents acteurs. La niche hématopoïétique est donc une structure dynamique qui présente une grande adaptabilité liée à ces interactions permanentes, et sa complexité suppose ainsi une régulation fine et précise de l'ensemble des processus cellulaires pour le maintien d'une hématopoïèse efficace.



# II.2.1.1 Le microenvironnement médullaire : une plateforme de signalisation

# Figure 14 : Représentation schématique des différents acteurs clés et fonctions des niches hématopoïétiques d'après (Mendez-Ferrer, Bonnet et al. 2020).

La régulation et le maintien de la fonctionnalité des CSHs ainsi que ceux de leurs progéniteurs va de pair avec le microenvironnement cellulaire. Un dialogue continu s'effectue entre ces cellules et leur microenvironnement par une signalisation paracrine et autocrine s'exerçant via la synthèse de différentes molécules telles que des molécules d'adhésion, des facteurs de croissance, des petits peptides et des cytokines. On peut également citer la production de chimiokines et de matrice extracellulaire (MEC) composée de fibronectine, protéoglycanes, laminine, glycosaminoglycanes ou encore de collagène de type I et IV (Papayannopoulou and Scadden 2008, Yu and Scadden 2016). Les différents acteurs cellulaires qui composent le microenvironnement cellulaire de la niche hématopoïétique sont variés et nombreux (Figure 16) :

- Des cellules stromales représentées par des Cellules Souches Mésenchymateuses (CSMs) et leurs différents progéniteurs, des adipocytes, des ostéoclastes et des ostéoblastes, des cellules sinusoïdales endothéliales et cellules endostéales.
- Des composants du système nerveux qui participent à l'architecture fonctionnelle de la niche hématopoïétique et qui comprennent des cellules de Schwann nonmyélinisantes et des neurones sympathiques.
- L'ensemble des cellules hématopoïétiques qui comprennent essentiellement des CSHs (et progéniteurs associés), des neutrophiles, des macrophages ou encore des lymphocytes T régulateurs.

Les CSMs jouent un rôle central dans la niche hématopoïétique via la synthèse de différentes molécules dont CXCL12, l'interleukine-7 (IL7) et Stem Cell Factor (SCF) (Ding and Morrison 2013, Greenbaum, Hsu et al. 2013, Cordeiro Gomes, Hara et al. 2016) qui favorisent la maintenance des CSHs. A l'inverse, d'autres molécules permettent d'induire la prolifération des CSHs comme par exemple la synthèse de FGF1 par les mégacaryocytes ou la production de ligands Notch par les cellules endothéliales.

Le rôle des adipocytes dans la niche hématopoïétique est quant'à lui toujours sujet à controverse à l'heure actuelle. En effet, on peut observer une augmentation de leur nombre au sein du microenvironnement médullaire de la MO lors du vieillissement, après des irradiations ou encore après traitements par chimiothérapies (Takeshita, Fumoto et al. 2014). Cette observation en corrélation avec d'autres travaux semble suggérer un effet inhibiteur des adipocytes sur les CSHs (Yokota, Oritani et al. 2000, Naveiras, Nardi et al. 2009, Omatsu, Sugiyama et al. 2010) notamment en ce qui concerne leur différenciation et leur croissance (Naveiras, Nardi et al. 2009). Toutefois, des travaux plus récents suggèrent un rôle important de ces derniers dans l'augmentation de l'hématopoïèse en réponse à une myéloablation chez la souris (Zhou, Yu et al. 2017). Les adipocytes sont capables de synthétiser du Stem Cell Factor (SCF) en quantités importantes, qui leur permet de jouer un rôle central dans le maintien des CSHs. L'équipe de Zhou et al a pu ainsi démontrer que l'inhibition génétique spécifique du SCF dans les adipocytes provoquait une diminution importante de la capacité des CSHs à régénérer la MO après myéloablation (Zhou, Yu et al. 2017). De plus, de manière intéressante, l'inhibition génétique spécifique du SCF dans d'autres types cellulaires importants de la MO tels que des cellules endothéliales, des ostéoblastes ou encore des CSHs elles-mêmes n'affectait en rien la régénération de la MO après traitement par irradiation ou 5fluorouracile.

Les cellules endothéliales jouent un rôle fondamental dans la vascularisation de la MO et produisent de nombreux facteurs qui régulent la fonctionnalité des CSHs et de leurs progéniteurs. Par exemple, l'expression de CXCL12 par les cellules endothéliales à proximité de la région périvasculaire dans la MO permet le maintien des CSH (Greenbaum, Hsu et al. 2013).

Les composantes neurales du microenvironnement médullaire et en particulier les cellules de Schwann non-myélinisantes sont cruciales dans le maintien de la dormance/quiescence des CSHs via la production de Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ). En effet, l'équipe de Yamazaki et al. a pu ainsi démontrer la contribution de ces cellules en réalisant des expériences de dénervation des nerfs sympathiques innervant la MO, provoquant la mort des cellules gliales dont les cellules de Schwann ce qui conduit à une perte rapide du stock de CSHs et à une réduction de leur capacité à former un stock fonctionnel et suffisant (Yamazaki, Ema et al. 2011).



Figure 15 : Composants cellulaires et moléculaires impliqués dans le dialogue avec les Cellules Souches Hématopoïétiques d'après (Pinho and Frenette 2019).

# II.2.1.2 Dérégulations de la niche hématopoïétique : prédisposition aux hémopathies malignes

La niche hématopoïétique subit au cours du temps des altérations spécifiques qui prédisposent au développement de pathologies cancéreuses en promouvant la survie et l'expansion de cellules hématopoïétiques mutantes qui contribuent ainsi à la progression maligne et en particulier à la protection les cellules cancéreuses via des traitements chimiothérapeutiques ou ciblés, ce qui contribue aux résistances et aux rechutes. Le rôle facilitateur de la niche hématopoïétique dans le développement ou la progression des hémopathies malignes comme la LAM ou les Syndrômes Myélodysplasiques (SMD) est désormais clairement établis sans que l'on puisse en déterminer les évènements initiaux (Duhrsen and Hossfeld 1996, Kim, Shim et al. 2015, Kim, Jekarl et al. 2015, von der Heide, Neumann et al. 2017). On peut toutefois supposer qu'à un moment défini, l'acquisition de mutations par certaines cellules ou le détournement du fonctionnement normal de la niche par des cellules malignes permet l'initiation de la maladie et sa progression.

Les CSLs sont ainsi capables de dialoguer avec la niche hématopoïétique pour la remodeler en un microenvironnement favorable à leur expansion (Boyd, Campbell et al. 2014). En effet, elles influencent ce dernier pour qu'il augmente par exemple l'expression de plusieurs molécules telles que VLA4 (intégrine  $\alpha 4\beta 1$ ) (Matsunaga, Takemoto et al. 2003), la glycoprotéine CD44 (Krause, Lazarides et al. 2006) ou encore le récepteur CXCR4 (Nervi, Ramirez et al. 2009, Zeng, Shi et al. 2009, Uy, Rettig et al. 2012, Pitt, Tikhonova et al. 2015), leur permettant ainsi de résister aux chimiothérapies ou aux thérapies ciblées.

Dans un modèle murin de LMC inductible, il a pu être démontré la stimulation directe de CSMs par les cellules leucémiques. Les CSMs, en réponse à la synthèse de CLL3 et TPO par les cellules leucémiques et à un contact direct cellule-cellule, vont produire de façon massive des progéniteurs ostéoblastiques altérés qui vont s'accumuler dans la MO. Ces derniers ont un profil pro-inflammatoire et ne sont pas capables de maintenir le caractère quiescent des CSHs normales, alors qu'ils vont favoriser le maintien des CSLs (Schepers, Pietras et al. 2013). Un autre exemple de dialogue entre les CSLs et leur microenvironnement décrit la mise en place d'une synthèse autocrine de BMP4 par les cellules souches leucémiques après traitement continu des patients par un ITK, en plus de celle du microenvironnement qui les favorisent, notamment par les CSMs. La résistance de cette sous-population de LSCs aux ITKs serait liée à la surexpression du facteur de transcription TWIST-1 et à mise en place d'un axe BMP4/BMPR1b (Grockowiak, Laperrousaz et al. 2017).

Dans la LAM, l'implication de la voie BMP dans un dialogue cellulaire favorisant les cellules leucémiques immatures est décrite. En effet, la sécrétion de BMP4 par le microenvironnement permet de favoriser le caractère souche de cellules leucémiques en se fixant à son récepteur BMPR1A présent préférentiellement à leur surface de ces cellules, et induit l'expression du facteur ΔNp73 qui augmente celle de NANOG, connue pour être responsable de l'acquisition de caractères souches et de reprogrammation de cellules matures en cellules immatures. L'activation de cette voie aboutie ainsi au renforcement de la résistance des cellules leucémiques immatures aux thérapies et représente un mauvais facteur pronostic (Voeltzel, Flores-Violante et al. 2018). La synthèse de CCL3 par les cellules leucémiques est également responsable de l'inhibition fonctionnelle des ostéoblastes dans un modèle murin de LMC en phase blastique, provoquant une perte sévère de minéralisation (Frisch, Ashton et al. 2012). D'autres études dans la LAM soulignent également l'inhibition de l'adipogenèse au détriment de la différentiation ostéoblastique des CSMs par les cellules leucémiques (Battula, Le et al. 2017, Boyd, Reid et al. 2017).

L'influence des CSLs sur le microenvironnement médullaire ne se limite pas aux CSMs. En effet, il a pu être démontré dans certains modèles murins de LAM une augmentation de la vascularisation de la MO, suggérant une influence positive des cellules leucémiques sur cet aspect (Hanoun, Zhang et al. 2014). De manière intéressante, l'équipe de Duarte et al. a démontré que les cellules leucémiques de LAM étaient capables de remodeler progressivement la vascularisation des régions centrales et endostéales de la MO (Duarte, Hawkins et al. 2018). En effet, les cellules de LAM procèdent à ce remodelage grâce à leur production de cytokines anti-angiogéniques et pro-inflammatoires qui permettent la dégradation progressive de l'endothélium endostéal, des ostéoblastes et des cellules stromales tandis que les régions centrales de la MO restent préservées pour favoriser l'expansion de la niche leucémique. Ainsi, les régions endostéales dégradées ne sont plus en mesure d'assurer les fonctions essentielles des CSHs, ce qui se traduit par une diminution de l'hématopoïèse normale et une migration transendothéliale des CSHs.

L'existence d'un dialogue cellulaire mutuel entre les adipocytes et les CSLs ne laisse désormais plus de place aux doutes. En effet, plusieurs équipes avaient déjà pu observer il y a une dizaine d'année une survie plus faible de patients obèses atteints de LAM (Meloni, Proia et al. 2001), de Leucémie Lymphoblastique Aiguë (Gelelete, Pereira et al. 2011) ou d'autres types d'hémopathies malignes comme les lymphomes ou les myélomes (Lichtman 2010) par rapport à des patients de poids normaux. Bien que l'obésité s'accompagne de nombreux facteurs de comorbidité, ces premières observations ont pu soulever les prémices de l'hypothèse d'un dialogue adipocytes/CSLs favorable à ces dernières pour résister davantage aux traitements et induire des rechutes. De plus, il semblerait que le tissu adipeux, désormais

considéré comme un organe majeur régulant des processus essentiels comme l'inflammation, le système endocrine ou encore le vieillissement (Blogowska, Rzepka-Gorska et al. 2005, Tran and Kahn 2010, Ouchi, Parker et al. 2011), soit également impliqué dans l'attraction de CSHs et de leurs progéniteurs (Blogowski, Ratajczak et al. 2012). Cet aspect chémo-attractant du tissu adipeux représente un élément majeur dans les processus de créations de niches qui permettent la migration et l'installation de populations cellulaires hétérogènes circulant dans le sang périphérique vers le tissu adipeux ce qui, dans le cas des leucémies, pourraient permettre la formation de niches secondaires très difficiles à cibler. De manière intéressante et complémentaire, il est désormais établi qu'une oxydation excessive des acides gras sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires (au bénéfice des cellules tumorales) soit à l'origine d'atrophies musculaires responsables du phénomène de cachexie dans les cancers en général, qui représente un des facteurs de comorbidité les plus importants et donc particulièrement délétère chez les patients atteints de leucémies qui présentent déjà d'importantes anémies. (Fukawa, Yan-Jiang et al. 2016).



Figure 16 : Modèle d'interaction entre les adipocytes et les Cellules Souches Leucémiques exprimant CD36 dans la Leucémie Myéloïde Chronique d'après (Thomas and Majeti 2016). Dans les leucémies myéloïdes, un sous-type de cellules souches leucémiques réside dans le tissu adipeux et exprime le récepteur de surface CD36 (free fatty acid scavenger receptor CD36). Ces cellules souches leucémiques sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 $\alpha$  et TNF- $\alpha$  qui stimulent la lipolyse via l'activation de protéines lipases qui provoquent la libération d'acides gras libres, qui sont internalisés dans les cellules souches leucémiques via leur transport par CD36. L'oxydation de ces acides gras au sein des mitochondries par carnitine O-palmitoyltransferase 1 (CPT1) fournit une source d'énergie pour ces cellules leucémiques supplémentaire par rapport à celles présentent dans la moelle osseuse ou dans la rate, ce qui contribuerait à leur quiescence et à leur résistance aux chimiothérapies.

Les composantes neurales de la niche hématopoïétique et en particulier les nerfs associés aux vaisseaux sanguins sont capables d'interagir et de favoriser certains cancers solides tels que le cancer de la prostate ou encore les cancers gastriques (Magnon, Hall et al. 2013, Hayakawa, Sakitani et al. 2017, Zahalka, Arnal-Estape et al. 2017) mais également des hémopathies malignes comme les néoplasmes myéloprolifératifs ou la LAM (Arranz, Sanchez-Aguilera et al. 2014, Hanoun, Zhang et al. 2014). Dans un modèle murin de LAM, l'équipe de Hanoun et al montre que la progression de la maladie, associée à une multiplication de cellules leucémiques dans la MO, provoque une destruction des fibres nerveuses sympathiques à proximité des artérioles, ces dernières dégénérant et promouvant davantage la maladie (Hanoun, Zhang et al. 2014). Le traitement de ces souris avec la 6-hydroxydopamine, qui est une molécule neurotoxique ciblant spécifiquement les neurones catécholaminergiques (sans affecter les cellules hématopoïétiques) (Katayama, Battista et al. 2006), permet d'observer une augmentation de l'infiltration de la MO par les cellules leucémiques. Ces résultats soulignent ainsi le rôle majeur des fibres nerveuses sympathiques dans le maintien d'une niche hématopoïétique fonctionnelle normale, et leur destruction par les cellules leucémiques de LAM dans la MO ou dans la rate renforce la progression de la maladie via la mise en place d'une niche altérée qui soutien davantage les cellules leucémiques et en particulier des progéniteurs plus différenciés.

# **CHAPITRE 3 : Cellules Souches Leucémiques**

# I. Les Cellules Souches Leucémiques

Les cellule souches leucémiques (CSLs) sont issues d'une transformation maligne de cellules (souches ou progéniteurs) hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse. Ces dernières, comme les cellules souches hématopoïétiques (CSH), conservent les propriétés fonctionnelles qui font d'elles des cellules souches à savoir la capacité de **se différencier**, le potentiel d'**auto-renouvellement** et la **quiescence**.

Ce concept de l'existence d'une telle sous-population de cellules leucémiques a émergé dans les années 90 et a été mis en évidence pour la première fois dans la LAM par l'équipe de John Dick. L'identification d'une sous-population (1/250 000 cellules) de cellules capables d'initier la LAM dans un modèle murin immunodéficient SCID (Lapidot, Sirard et al. 1994). Il a ensuite été démontré que ces cellules étaient immatures en termes de différenciation et exprimaient les mêmes marqueurs phénotypiques que leurs homologues normales CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, ce qui a renforcé l'idée que cette population maligne émergeait de CSH plutôt que de cellules hématopoïétiques matures déjà différenciées (Bonnet and Dick 1997).

Par la suite, des cellules souches cancéreuses (CSC) d'une manière plus générale, ont pu être identifiées dans un large spectre d'autre pathologies cancéreuses telle que le cancer du sein (Al-Hajj, Wicha et al. 2003), du cerveau (Singh, Hawkins et al. 2004), de la prostate (Collins, Berry et al. 2005), du pancréas (Li, Heidt et al. 2007) ou encore du colon (O'Brien, Pollett et al. 2007). Dans la suite de mon manuscrit, je me concentrerai très majoritairement sur les CSLs dans la LMC.



Figure 17 : Modèle de l'émergence de Cellules Souches Leucémiques dans la Leucémie Myéloïde Chronique d'après (Riether, Schurch et al. 2015). Durant l'hématopoïèse normale, les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) présentent une capacité illimitée d'autorenouvellement (indiquée par la flèche courbée) et peuvent donner naissance à des progéniteur multipotents (MPPs) qui eux ont un autorenouvellement limité. Les MMPs se différencient davantage en progéniteurs communs lymphoïdes, myéloïdes (CLPs et CMPs) et progéniteurs granulocytaire-macrophage (GMPs) perdent en qui leur capacité d'autorenouvellement. Les LRPs prolifèrent beaucoup et sont à l'origine de l'ensemble des types cellulaires matures de la circulation sanguine. La formation d'une cellule souche leucémique (LSC) dans une leucémie myéloïde pourrait résulter de mutations de ces cellules à différentes étapes de la hiérarchie hématopoïétique. (a) Chez des patients atteints de LMC en phase chronique, la présence de BCR-ABL dans les cellules à tous les niveaux de la hiérarchie hématopoïétique suggère que les LSCs dérivent de HSC ou d'un MMP précoce ayant une capacité de différentiation vers plusieurs lignés (cell-of-origin). L'oncogène BCR-ABL est nécessaire et suffisant pour le maintien de la LMC, et aucune autre altération génétique n'est nécessaire pour la progression de la maladie en phase chronique. (b) A l'inverse, chez des patients atteints de LMC en crise blastique ou de LAM, les LSCs présentent des phénotypes de LRPs comme des lymphoid-primed MPPs (LMPPs) ou des GMPs. Ces éléments soutiennent l'idée que des cellules bien plus différenciées peuvent donner naissance à des CSLs après l'acquisition de caractéristiques d'autorenouvellement (progenitor cell-oforigin). (c) De plus, la démonstration que certaines LSCs dans la LAM expriment de faibles

niveaux de marqueurs de surfaces propres aux différentes lignées soulève la question de savoir si des cellules plus différenciées pourraient aboutir à l'émergence de LSCs. (d) Dans la phase 'pre-leukemic' de la maladie, les LSCs sont en expansion clonale et accumulent des mutations supplémentaires (e) ce qui aboutit au développement de plusieurs clones leucémiques. B, B cell; CML, chronic myeloid leukemia; E, erythrocyte; G, granulocyte; NK, natural killer cell; M, monocyte; MEP, megakaryocyte-erythrocyte progenitor; P, platelet; T, T cell)

L'identification fonctionnelle de ces CSC a poussé de nombreuses équipes à chercher à les discriminer de leurs homologues normales via l'identification de marqueurs de surface qui leurs seraient spécifiques. Comme les CSH, les CSL dans la LMC expriment de la même manière les marqueurs CD34<sup>+</sup> et CD38<sup>-</sup>. Plusieurs études ont cependant pu mettre en évidence différentes protéines de surface présentant une différence d'expression suffisante par rapport aux CSH ou aux progéniteurs différenciés avec une certaine stabilité d'expression permettant d'envisager un ciblage phénotypique de ces CSL. Néanmoins, à l'heure actuelle, il demeure impossible de distinguer clairement et définitivement les CSL des CSH via l'expression exclusive de marqueurs de surfaces.

Dans la LMC, il est désormais clairement établi que les CSLs se trouvent majoritairement dans la moelle osseuse où elles nichent dans un microenvironnement protecteur, demeurant ainsi résistantes aux traitements conventionnels. Ce microenvironnement est soupçonné de contribuer fortement à leur quiescence via des signaux. Par exemple, l'analyse de cellules souches de patients par une technique combinant à la fois du single-cell et du séquençage ARN a permis de démontrer la présence de CSHs sous l'influence d'un dialogue extrinsèque, favorisant l'expression des gènes TGF- $\beta$  et TNF- $\alpha$  dans ces cellules et associée à une augmentation de quiescence. De plus, ces CSHs pro-inflammatoires sont tout à fait distinctes des CSHs normales au niveau de leur profil d'expression, et une sous-population de ces cellules a pu être détectée chez des patients au diagnostic qui n'ont pas répondu aux ITKs (Giustacchini, Thongjuea et al. 2017).

Il existe à l'heure actuelle des pistes plus prometteuses que la recherche de nouveaux marqueurs de surface qui visent à caractériser des voies de signalisations dérégulées pour pouvoir distinguer de manière fonctionnelle les CSHs et les CSLs qui se retrouvent fortement associées à des processus d'auto-renouvellement/quiescence/différenciation. Ces voies de signalisation sont nombreuses et comprennent notamment les voies PI3K/Akt/mTOR, JAK/STAT, BMI1 et les PKC que je développerai à titre d'exemples. Cependant, il n'est toujours pas possible à l'heure actuelle de différencier définitivement les CSL des CSHs.

# III.1 Voies de signalisations des Cellules Souches Leucémiques

### III.1.2 La voie PI3K/Akt/mTOR

Les phosphoinisitides 3-kinases (PI3Ks) sont des protéines cytosoliques dont les voies de signalisations régulent de nombreuses fonctions cellulaires telles que la différentiation, la prolifération, la survie ou encore la transformation maligne (Martini, Ciraolo et al. 2013). La principale fonction de ces enzymes est de phosphoryler la position 3 d'un groupe hydroxyl (3-OH) sur l'anneau inositol d'un phosphatidylinositol (Franke, Kaplan et al. 1997). Ces protéines sont classées en 3 différentes classes : classe I, II, et III en fonction de leur structure primaire, de leur spécificité vis-à-vis de leur substrat et de leur régulation.

Class I	Subu Regulatory	nits Catalytic	Substrate Specifity	Activator	Tissue Distribution	
Class IA -ABD-RBD-C2 Helical Kinase	p85α p85β p55α p55γ p50α	p110α p110β p110δ	PI PIP PIP <sub>2</sub>	Receptor tyrosine kinases Ras	p110α, p110β: ubiquitous p110δ: leukocytes	
Class IB Pr → Class IB Class IB C2 Helical Kinase	p101 p84	p110y	PI PIP PIP <sub>2</sub>	G-protein-coupled receptors (Gβγ) Ras	leukocytes	
Class II						
-Pr Pr C2 Helical Kinase C2	-	ΡΙ3ΚC2α,β,γ	PI PIP	Receptor tyrosine kinases G-protein-coupled receptors	PI3KC2α,C2β: ubiquitous PI3KC2γ. liver	
Class III						
C2 Helical Kinase	p150	Vps34p analogues	Ы	Constitutively active G-protein-coupled receptors (Ga)		
ABD – Adaptor Binding Domain	Kinase – Kinase Domain			SH2 – Sre Homology Type 2 Domain		
RBD – Ras Binding Domain	SH3 - Src Homology Type 3 Domain			$G\beta\gamma - G\beta\gamma$ -binding Site	e	
C2 – C2 Domain	Pr - Proline-rich	Pr – Proline-rich Domain				
Helical – Helical Domain	GAP – Bcr/Rac GAP Homology Domain					

Figure 18 : Vue d'ensemble des différentes classes de PI3Ks. d'après (Doepfner, Boller et al. 2007).

Les trois classes de PI3K comprennent en tout 8 isoformes. La classe I est sous-divisée en classe IA et IB par rapport à leur mécanisme d'activation. Alors que certaines isoformes sont ubiquitaires, d'autres tels que les formes p110γ ou p110δ sont plutôt tissu-spécifiques.

Une des cibles les mieux caractérisées des PI3Ks de classe I est la protéine kinase B (PKB) plus connue sous le nom de Akt. Akt est une sérine/thréonine kinase qui est un acteur majeur de la survie, de la croissance cellulaire et du métabolisme glucidique. Son activation complète

passe par sa phosphorylation sur sa sérine 473 par mTORC2 et sa thréonine 308 par PDK1. Les protéines Akt forment une famille de trois isoformes : Akt1 est la plus impliquée dans la régulation de la synthèse protéique et du cycle cellulaire (Yang, Tschopp et al. 2004). Akt2 joue un rôle critique dans le métabolisme glucidique et le développement ou la maintenance d'un tissu adipeux fonctionnel (Garofalo, Orena et al. 2003). Le rôle d'Akt3 n'est pas bien caractérisé à l'heure actuelle mais elle est principalement exprimée au niveau du cerveau (Masure, Haefner et al. 1999, Yang, Tschopp et al. 2004).

Akt présente de très nombreux substrats dont mTOR qu'elle active via tuberous sclerosis 1/2 complex (TSC1/2). mTOR est une sérine/thréonine kinase qui régule de nombreux processus physiologiques tels que le métabolisme, la croissance cellulaire ou encore la survie. La régulation de ces processus passe par un contrôle minutieux de plusieurs évènements tels que la biogenèse ribosomal, l'inhibition de l'apoptose et de l'autophagie, ou encore l'incorporation d'acides aminés (Zoncu, Bar-Peled et al. 2011). mTOR peut se distinguer en deux complexes différents que sont mTORC1 et mTORC2 (Bhaskar and Hay 2007).



Figure 19 : Illustration des complexes mTORC1 et mTORC2 d'après (Gao, Li et al. 2012) .

Le complexe mTORC1 est composé de mTOR, de regulatory-associated protein of mTOR (RAPTOR), de proline-rich AKT substrate of 40 kDa (PRAS40), de mammalian lethal with sec-13 (MIst8) et de G protein β subunit-like (GβL) (Bhaskar and Hay 2007). Le complexe mTORC2 quant'à lui comprend également mTOR et mIst8 mais diffère par la présence de rapamycininsensitive companion of mTOR (RICTOR), protein observed with Rictor-1/Proline-rich protein 5 (PROTOR/PRR5) et mammalian stress-activated protein kinase-interaction protein 1 (mSIN1). (Bhaskar and Hay 2007).

Le complexe mTORC1 agit principalement sur eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E binding protein (4E-BP1) et S6K1 (Wullschleger, Loewith et al. 2006). La phosphorylation de 4E-BP1 par mTORC1 provoque sa séparation de eIF4E, ce dernier pouvant ainsi s'associer

avec eIF4G pour former le complexe d'initiation de la traduction eIF4F, essentiel pour la traduction cap-dépendante de très nombreuses protéines dont c-Myc et cyclin D1 à titre d'exemple.

Ainsi, ces trois protéines forment une voie de signalisation majeure dans la LMC, la voie PI3K/AKT/mTOR.



Figure 20 : La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR d'après (Gurska, Ames et al. 2019).

Dans ce contexte leucémique, BCR-ABL active directement l'axe PI3K/Akt/mTOR, permettant ainsi l'expression de nombreux facteurs de transcriptions tels que nuclear factor kappa-lightchain-enhancer (NF-kB) et forkhead box class O (FoxO). BCR-ABL phosphoryle PI3K, ce qui permet l'activation d'Akt et ainsi celle de mTOR.

De manière intéressante, l'inhibition de cette voie dans la LMC via le ciblage de PI3K permet de sensibiliser à la fois les cellules progénitrices mais également les CSLs au Nilotinib. (Airiau, Mahon et al. 2013).

# III.1.3 La voie JAK/STAT

La voie de signalisation Janus kinases/signal transducers and activators of transcription (JAK-STAT) joue un rôle prépondérant dans la transduction de nombreux signaux cytokiniques qui permettent de contrôler la différenciation, la prolifération, la survie, l'apoptose et la migration (O'Shea and Murray 2008, Schindler and Plumlee 2008).

Les protéines de la famille JAK forment en tout 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et la tyrosine kinase 2 (Tyk2). Ces 4 protéines partagent une structure commune qui comprend 7 domaines d'homologie JAK (JAK homology domains, JHD) (Giordanetto and Kroemer 2002).



N-terminal domain

Figure 21 : Schéma de la structure des protéines JAK et STAT d'après (Nan, Wu et al. 2017).

Protein domains of Janus kinase (JAK) and signal transducer and activator of transcription (STAT). (A) Structure illustration of structural and functional domains in JAK. JAKs share seven regions of high homology [Janus homology domains (JHD) 1-7], JHD1 has been shown to encode the kinase while JHD2 represents a pseudo-kinase domain to regulate JH1 catalytic activity. (B) Structure illustration of structural and functional domains in STAT. All STATs share six conserved domains, including an N-terminal domain, a coiled-coil domain, the DNA-binding domain, a linker domain, an Src homology 2 (SH2) domain, and C-terminal transactivation domain.

La famille des protéines STAT comprend 7 membres (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6). Ces protéines présentent une structure similaire avec différents domaines conservés tels qu'un domaine SH2, un domaine de liaison à l'ADN, un coiled-coiled domain (CCD), un amino terminal domain (NH2), un linker domain et enfin un transcriptional activation domain (TAD) en C-terminal. Le domaine de liaison à l'ADN est essentiel aux protéines STAT parce qu'il leur permet d'exercer leur rôle de facteur de transcription lorsque ces dernières se situent au niveau nucléaire où elles peuvent ainsi se fixer au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles. Le domaine TAD représente le site où se trouve le résidu tyrosine phosphorylé qui permet leur l'activation et leur identification au sein des différentes proteins STAT. En ce qui concerne les autres domaines, ces derniers sont impliqués dans les interactions entre STAT et d'autres partenaires protéiques (Strehlow and Schindler 1998).

Cette voie de signalisation permet la transmission d'un signal extracellulaire au sein des cellules via la membrane plasmique. La voie JAK/STAT repose ainsi sur l'interaction entre les protéines JAK qui sont inactive en l'absence de stimulus et les protéines STAT qui sont localisées dans le cytoplasme. Le déclenchement de la voie JAK/STAT est provoqué par un changement conformationnel des protéines JAK en réponse à un signal extracellulaire sous forme cytokinique. Cette activation des protéines JAK permet la phosphorylation activatrice des protéines STAT au niveau d'un résidu tyrosine dans leur domaine de transactivation, ces dernières se dimérisent ensuite en interagissant avec d'autres protéines STAT phosphorylées via leurs domaines SH2 respectifs. Les protéines STAT changent de localisation cellulaire en entrant dans le noyau cellulaire où elles activent leurs gènes cibles.

L'activation anormale de la voie JAK/STAT a été décrite dans de nombreux cancers hématologiques tels que la Leucémie Myéloïde Aiguë, les Lymphomes de type B, les Syndromes Myélodysplasiques ou encore la LMC (Valentino and Pierre 2006). Par exemple, la mutation V617F de JAK2, située dans son domaine pseudo-kinase, entraîne une activité tyrosine kinase constitutive de JAK2 qui peut alors activer transcriptionnellement STAT5 de manière continue. Cette mutation est retrouvée dans plus de 80 % des cas de polyglobulie de Vaquez, un syndrome myéloprolifératif chronique caractérisé par une hypersensibilité aux cytokines et une érythrocytose importante. Cette mutation aurait un rôle majeur dans la réponse cytokinique anormale et la pathogénie de cette maladie (James, Ugo et al. 2005).

Dans la LMC, STAT5 a été décrite comme pouvant être activée par les formes P190 et P210 de BCR-ABL (Carlesso, Frank et al. 1996, llaria and Van Etten 1996) Ainsi, l'activation de STAT5 par BCR-ABL permet d'augmenter la résistance des cellules leucémiques à une mort cellulaire de type apoptotique via l'augmentation de l'expression du membre anti-apoptotique Bcl-xL et une inhibition d'arrêt du cycle cellulaire via l'augmentation de cyclin D1 (de Groot, Raaijmakers et al. 2000), soulignant ainsi le rôle prépondérant de STAT5 dans la survie de ces cellules leucémiques (Baskiewicz-Masiuk, Masiuk et al. 2003). De plus, des niveaux élevés d'expression de STAT5 sont corrélés à une résistance aux ITKs (Nam, Williams et al.

2007), cette résistance pouvant être expliquée par une augmentation de l'expression de la pompe à efflux P-glycoprotein (Yamada, Ozaki et al. 2011). Par ailleurs, l'activation constitutive de STAT5 via JAK1 ou JAK2 été démontrée au sein des CSLs (Warsch, Grundschober et al. 2013). De manière intéressante, la protéine STAT5A semble jouer un rôle déterminant dans la pathogenèse de la LMC, son inactivation spécifique dans des cellules de MO empêchant l'induction et le maintien de la maladie (Copland, Hamilton et al. 2006).

Au niveau des CSLs dans la LMC, il a été démontré de manière intéressante que la coinhibition de STAT5 d'une part par l'action de l'Imatinib sur son activation (via l'axe BCR-ABL/STAT5) et d'autre part par la Pioglitazone sur son expression (via l'axe PPARγ-STAT5-HIF2α) provoque une sortie de quiescence des CSLs qui meurent ensuite par apoptose. (Prost, Relouzat et al. 2015). L'action combinée de l'Imatinib et de la Pioglitazone permet ainsi d'éliminer les cellules les plus différenciées et les cellules quiescentes qui deviennent sensibles à la synergie de ces deux molécules alors qu'elles demeurent insensibles à cet ITK en monothérapie.

De manière similaire à STAT5, la protéine STAT3 est plus récemment décrite dans la LMC pour son rôle essentiel dans la résistance aux ITKs via la maintenance des CSLs au sein de l'axe JAK1/STAT3 (Eiring, Kraft et al. 2014, Kuepper, Butow et al. 2019). L'implication d'une voie JAK2/STAT3 est également décrite dans la LMC, où sa co-activation avec la voie Smad 1/5/8 dans une sous-population de CSLs surexprimant BMPR1B permet de favoriser leur quiescence dans un contexte d'interactions avec des cellules stromales au sein de la niche hématopoïétique. L'activation de ces voies de signalisation est favorisée par la liaison de BMP4 au récepteur BMPR1B, ce qui induit une répression de gènes associés à la prolifération et une activation de gènes favorisant la quiescence (Jeanpierre, Arizkane et al. 2021).

### III.1.5 La voie Hedghehog

La voie Hedgehog (Hh) joue un rôle fondamental dans le développement embryonnaire et la régénération tissulaire chez l'adulte.



**Figure 22:** Voie de signalisation Hedgehog d'après (Yao and Chuang 2015). *Mammalian* Hedgehog (Hh) signal transduction. (A) In the absence of Hh ligand, the 12-pass transmembrane protein, Patched (Ptch), inhibits the activity of the seven-pass transmembrane protein Smoothened (Smo). Suppressor of Fused (Sufu) sequesters Gli2/3 in the cytosol and perhaps also in other subcellular locales such as the cilium and the nucleus. Phosphorylation of Gli by the kinases, PKA, CK1 and GSK3β, promotes the formation of Gli repressor (GliR), a process that is also facilitated by Sufu. GliR enters the nucleus and inhibits the expression of target genes (e.g., Hip1, Gli1, and Ptch1). (B) Hh ligand binds to its receptor, Ptch, and its coreceptors (e.g., Boc, Cdon, and Gas1), relieving the inhibition of Smo by Ptch. Ptch is internalized and degraded, and Smo is enriched on the primary cilium. Smo is activated through phosphorylation of its C-terminal tail. This is associated recruitment of the Sufu-Gli2/3 protein is processed into its activator form (GliA), which enters the nucleus and promotes the expression of target genes.

L'activation de la voie Hh repose en premier lieu sur l'activation du récepteur Patched1 (Ptch1). En absence de ligand, le récepteur Ptch1 inhibe la protéine Smoothened (Smo), ce qui permet au complexe Suppressor of fused (SUFU) de générer le facteur de transcription gliomaassociated oncogene repressor (GLiR) qui va se fixer sur les promoteurs des gènes cibles de la voie Hh et inhiber leur transcription.

La liaison des ligands Hh (au nombre de 3 chez les mammifères) Desert Hedgehog (DHH), Indian Hedgehog (IHH) ou Sonic Hedgehog (SHH) au récepteur Ptch1 entraîne la levée de l'inhibition de Smo, qui stabilise kinesin family member 7 (KIF7) et (GLiA), ce dernier permettant l'activation de la transcription des gènes cibles de la voie Hh.

Dans les hémopathies malignes, la voie Hh a été démontrée essentielle pour le maintien et l'expansion des CSLs. En effet, l'activation exacerbée de cette voie dans des cellules CD34+ de LAM peut être inhibée avec un antagoniste de Smoothened, la cyclopamine. Cette molécule permet également de réduire la résistance de cellules primaires de LAM à la cytarabine. (Kobune, Takimoto et al. 2009).

Dans la LMC, l'équipe de Chen Zhao a démontré que la cyclopamine avait la capacité de cibler le compartiment souche leucémique dans un modèle murin de transplantation hématopoïétique, avec une meilleure efficacité aux stades précoces. L'inhibition pharmacologique de la voie Hh dans la LMC pourrait ainsi permettre à terme de limiter l'émergence de résistances suite aux monothérapies continues, d'autant plus que la voie Hh favoriserait la progression de la maladie vers la phase blastique (Zhao, Chen et al. 2009).

### III.1.1 Protéines du groupe Polycomb (PcG)

Les protéines de cette famille sont connues pour maintenir la répression transcriptionnelle de leurs gènes cibles via leur action au niveau de la chromatine, elles agissent en formant des complexes multimériques appelés Polycomb Repressive Complex (PRC) de type 1 ou 2 (Hughes, Saglio et al. 2009). Ils sont très conservés au cours de l'évolution, soulignant ainsi leur importance fonctionnelle.



Figure 23 : Les complexes PRC et leur activité enzymatique d'après (Vissers, van Lohuizen et al. 2012).

Les complexes PRC1 et PRC2 régulent la transcription de leurs gènes cibles en se fixant au niveau de motifs particuliers présents sur l'ADN appelés PcG response elements (PRE). Le complexe PRC2 catalyse la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3) des nucléosomes : cette marque permet le recrutement du complexe PRC1 qui va maintenir la répression transcriptomique des gènes cibles associés au PRE via deux mécanismes : soit par interaction directe au niveau du promoteur des gènes cibles soit par compaction de la chromatine. La protéine BMI1, codée par le proto-oncogène du même nom, appartient à la famille des protéines du groupe Polycomb (PcG). Je consacrerai la partie suivante essentiellement à la protéine BMI1 qui représente un acteur de la leucémogenèse au centre de mon travail de thèse.

B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 (BMI1) est exprimé ubiquitairement avec des niveaux élevés dans certains organes comme le cerveau, les glandes salivaires, les poumons ou encore la moelle osseuse (Sanchez-Beato, Sanchez et al. 2006). Sur le plan fonctionnel, BMI1 a été identifié pour la première fois en tant qu'oncogène pour sa capacité à coopérer avec C-MYC pour induire un lymphome murin de type B (van Lohuizen, Verbeek et al. 1991). L'action de la protéine BMI1, qui n'exprime aucune activité enzymatique, ne peut s'exercer qu'au sein d'un complexe protéique, le polycomb repressive complex 1 (PRC1), en s'associant avec d'autres partenaires protéiques comme RING1A/B, HPH (1 à 3) et CBX (2,4,6,7 ou 8) (Simon and Kingston 2009). Dans de tels complexes, BMI1 et RING1B vont pouvoir s'hétérodimériser via leur domaines RING respectifs (Buchwald, van der Stoop et al. 2006), ce qui va permettre de catalyser l'étape finale de la conjugaison de

l'ubiquitine sur l'histone H2A (Li, Cao et al. 2006). Cette activité de PRC1 dans lequel intervient BMI1 permet la répression transcriptionnelle épigénétique de gènes, c'est-à-dire qu'en modifiant post-traductionnellement certains résidus des queues d'histones, PRC1 va empêcher la transcription de ses gènes cibles. Ces modifications vont moduler la compaction de la chromatine et donc l'accessibilité de l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle.

BMI1 étant une protéine affectant de nombreuses voies de signalisations différentes, elle présente une régulation fine aux niveaux transcriptionnels, post-transcriptionnels et post-traductionnels.

Au niveau transcriptionnel, l'expression de *BMI1* est régulée par plusieurs facteurs de transcriptions comme E2F1, Sp1, C-MYC, SALL4 ou encore Twist1 (Nowak, Kerl et al. 2006, Yang, Chai et al. 2007, Martin and Cano 2010, Wang, Liu et al. 2013). Ainsi, C-MYC et E2F-1 activent l'expression de BMI1 en se fixant à son promoteur notamment dans des cellules de neuroblastome (Nowak, Kerl et al. 2006, Huang, Cheung et al. 2011). De manière similaire, Sp1 et SALL4 vont augmenter les niveaux d'expression de BMI1 mais à la fois dans un contexte normal ou cancéreux (Yang, Chai et al. 2007, Wang, Liu et al. 2013).

Au niveau post-transcriptionnel, *BMI1* est décrit depuis quelques années pour être la cible de plusieurs miRNA, capables de réguler son expression dans plusieurs types de cancers. De manière similaire à sa régulation transcriptionnelle, les niveaux d'expression de *BMI1* pourront être régulés positivement ou négativement. A titre d'exemple, la diminution du niveau d'expression de BMI1 par le miR-128 a été décrite dans des cellules souches de cancer prostatique (Jin, Zhang et al. 2014), par le miR-320a dans le carcinome nasopharyngé jouant ainsi le rôle de suppresseur de tumeur (Qi, Li et al. 2014), ou encore par le miR-495 dans les cellules de cancer du sein inhibant ainsi fortement leur prolifération (Wang, Liu et al. 2015). A l'inverse, les miR-130b, 22 ou encore 30e vont augmenter le niveau d'expression de BMI1 respectivement dans les cancers du cerveau (Zhu, Wang et al. 2015), du sein (Song, Poliseno et al. 2013) ou encore gastrique (Sugihara, Ishimoto et al. 2013) ce qui se traduit respectivement par un renforcement du phénotype souche, une augmentation du potentiel métastatique et une progression tumorale.

Enfin, au niveau post-traductionnel, la régulation de BMI1 va s'opérer soit de manière irréversible soit de manière réversible. Les régulations post-traductionnelles irréversibles de BMI1 font intervenir le système ubiquitine-protéasome tandis que les régulations réversibles passent par des modifications protéiques telles que des processus de sumoylation, d'acétylation ou de phosphorylation. Par exemple, la protéine AKT peut phosphoryler BMI1 au niveau du résidu Ser316 dans un modèle de Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs), ce qui va provoquer la dissociation de BMI1 du locus Ink4a-Arf qu'il réprime en temps normal et

empêcher les cellules de proliférer (Liu, Liu et al. 2012). Un autre exemple de régulation posttraductionnelle réversible de BMI1 décrit sa sumoylation au niveau du résidu Lys88 par CBX4 lors de dommages à l'ADN ce qui permet le recrutement de BMI1 au site d'intérêt. Enfin, BMI1 peut être ubiquitiné par l'E3 ligase  $\beta$ -TrCP au niveau de son C-terminal ce qui va entraîner sa dégradation par le protéasome (Sahasrabuddhe, Dimri et al. 2011).

BMI1 intervient dans de nombreux processus cellulaires tels que le stress oxydatif, l'apoptose, l'auto-renouvellement des cellules souches ou encore la réparation de dommages à l'ADN dont j'évoquerai plusieurs exemples.

A ce jour plusieurs travaux ont pu souligner l'importance de BMI1 dans la régulation de processus oxydatifs. En effet, l'équipe de Liu et al. a pu démontrer, en utilisant un modèle murin déficient en BMI1, l'importance de ce dernier dans le maintien de la balance redox et la fonction mitochondriale. Les cellules hématopoïétiques de ces souris BMI1-/- présentent une augmentation de leurs niveaux intracellulaires de ROS avec des défauts mitochondriaux au niveau de la chaîne respiratoire (Liu, Cao et al. 2009). De manière intéressante, la supplémentation de N-acétylcystéine qui est un antioxydant permet de restaurer la fonctionnalité des thymocytes de ces souris BMI1-/- au même niveau que celle des thymocytes normaux simplement en diminuant leur niveau intracellulaire de ROS. BMI1 régule également les concentrations de radicaux libres dans les neurones, son invalidation génétique entraînant une accumulation de p53 et de corépresseurs au niveau de promoteurs de gènes antioxydants, provoquant ainsi une diminution du niveau d'expression de ces gènes tels que Sestrin1, GST1-a, Aldh6a1 ou encore Nrf1 (Chatoo, Abdouh et al. 2009). Le rôle antioxydant de BMI1 au niveau des neurones diminue au cours du vieillissement chez l'Homme ou la souris avec une augmentation des niveaux de ROS dont l'accumulation est délétère au niveau des lipides et de l'ADN (Abdouh, Chatoo et al. 2012).

Une des cibles majeures de BMI1 est le locus CDKN2A qui code pour les gènes suppresseurs de tumeurs p16INK4A and p14ARF. La répression de ce locus par BMI1 empêche l'activation de l'axe p53-pRb ce qui entraîne par exemple un maintien du caractère souche des cellules souches hématopoïétiques, les rendant résistantes au stress oxydatif, à l'apoptose et à la sénescence. A l'inverse, l'expression de p14ARF permet la stabilisation de p53 ce qui induit l'expression de p21WAF1/CIP1, conduisant à l'activation de membres de la famille pro-apoptotique comme BAD et BAX et à la mort par apoptose des cellules.

Dans un contexte pathologique, les complexes PRC1 et PRC2 sont connus pour être impliqués dans la progression des tumeurs solides et hématologiques, étant donné l'importance fonctionnelle des modifications de la chromatine dans le maintien de l'identité cellulaire
(Laugesen and Helin 2014). Les complexes polycombs, issus de l'agrégation de protéines du même nom, répriment ainsi de nombreux gènes impliqués dans des processus antitumoraux tels que l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire ou encore la sénescence. A titre d'exemple, les polycombs sont capables d'inhiber des gènes responsables de l'inhibition du cycle cellulaire comme les inhibiteurs de kinase cycline-dépendante (Cdk). Cette inhibition peut être réalisée par les protéines RING1B, EZH2 ou encore BMI1 via leur répression du locus *CDKN2A* contenant les gènes *p16INK4A p14ARF* et impliquées dans la progression du cycle cellulaire vers la phase G1 par l'inhibition du complexe Cyclin D-CDK4/6 (Gil and Peters 2006, Maertens, El Messaoudi-Aubert et al. 2009). BMI1 est essentielle à l'auto-renouvellement des CSH, mais également à celui des CSL (Lessard and Sauvageau 2003, Park, Qian et al. 2003). De plus, la surexpression de BMI1 dans les CSH leur confère une résistance accrue au stress oxydatif (Nakamura, Oshima et al. 2012).

Il semblerait que BMI1 joue un rôle très important en cancérogénèse étant donné sa surexpression dans de nombreux cancers comme le lymphome, le médulloblastome, la LAM ou encore le cancer du sein (Glinsky, Berezovska et al. 2005). Ce niveau d'expression élevé favorise la coopération oncogénique qui est essentielle dans l'initiation et le maintien de la carcinogenèse. A l'inverse, l'inhibition de BMI1 est décrite pour contrecarrer l'évolution de certains cancers comme le cancer de la tête et du cou (Wang, Li et al. 2017), le gliome où cela aboutit à la sénescence des cellules cancéreuses (Balakrishnan, Danis et al. 2020) ou encore dans le cancer épidermoïde où cela permet l'élimination de CSCs (Jia, Zhang et al. 2020).

Dans la LMC, si l'implication de BMI1 n'est pas établie à ce jour dans l'initiation de la maladie, il a néanmoins été démontré un rôle coopératif avec l'oncogène BCR-ABL dans la stimulation de la prolifération et de l'auto-renouvellement de progéniteurs immatures CD34<sup>+</sup> après leur transduction. (Rizo, Horton et al. 2010). De plus, son expression est corrélée avec l'évolution de la LMC de la phase chronique vers les phases les plus avancées (Mohty, Yong et al. 2007, Saudy, Fawzy et al. 2014) et est augmentée chez les patients LMC par rapport à des sujets sains (Bhattacharyya, Mihara et al. 2009, Rizo, Horton et al. 2010, Saudy, Fawzy et al. 2014).

A la vue de l'importance de BMI1 dans l'initiation et la progression des cancers, plusieurs tentatives pour développer des inhibiteurs spécifiques ont émergé. L'équipe de John Dick à Toronto a pu développer un inhibiteur de BMI1, le PTC-209, très efficace pour éliminer les cellules souches cancéreuses dans le cancer du côlon mais son utilisation en cancérologie n'a pas franchi le cap des essais de phases cliniques. Malgré ce revers, la preuve de concept d'élimination de CSCs via l'inhibition de BMI1 fut établie (Kreso, van Galen et al. 2014).

Concernant BMI1, les travaux de mon équipe ont pu identifier, avant mon arrivée au laboratoire, une nouvelle cible de cette protéine polycomb dans la LMC : la cyclin G2 (CCNG2)

(Mourgues, Imbert et al. 2015). En effet, mon équipe a pu démontrer dans ce contexte leucémique l'implication de BMI1, au sein du complexe PRC1, pour réprimer directement le gène *CCNG2* dans les cellules de LMC. L'extinction de BMI1 induit la réexpression de CCNG2 ce qui va conduire à une réponse autophagique délétère dans les cellules leucémiques en activant la protéine kinase PKCζ via son interaction avec le complexe phosphatase PP2A. De plus, mon équipe a pu observer une corrélation inversée entre les niveaux d'expressions de BMI1/CCNG2 au cours de l'évolution de la maladie des phases les plus précoces vers les phases les plus tardives, avec une augmentation du niveau de *BMI1* et une diminution du niveau de *CCNG2*.

La CCNG2 est une cycline atypique parce que celle-ci n'est associée à aucune protéine cycline-dependent kinase (CDK) à l'heure actuelle. De plus, contrairement à la plupart des cyclines qui jouent un rôle favorisant la progression du cycle cellulaire, la CCNG2 s'inscrit dans des processus de maintien de quiescence en induisant un arrêt du cycle cellulaire tout comme les cyclines G1 et I (Bernaudo, Khazai et al. 2017).

Dans les cancers, la CCNG2 a été décrite pour avoir un rôle ambivalent, tantôt suppresseur de tumeur tantôt d'agent pro-tumoral. En effet, dans le cas du gliome, elle est décrite pour avoir un rôle de suppresseur de tumeur via une inhibition de la glycolyse en interagissant avec la lactate déshydrogénase A, ce qui induit une mort de type apoptotique (Li, Gao et al. 2019). Cette fonction de suppresseur de tumeur est inhibée lorsque l'expression de CCNG2 est réprimée comme c'est le cas dans le carcinome colorectal, les cancers de la thyroïde ou de l'œsophage (Li, Liu et al. 2013, Chen, Liu et al. 2014, Sun, Zhang et al. 2014). A l'inverse, CCNG2 peut avoir une action oncogénique comme par exemple dans le cancer du pancréas où son expression est corrélée avec la progression de la maladie (Rothermund, Gopalakrishnan et al. 2005).

Le rôle de cette cycline atypique mériterait d'être davantage élucidé à la vue de son potentiel antitumoral dans de nombreux cancers, mais également pour préciser son rôle pro-tumoral et ainsi avoir un éventail d'action plus précis pour envisager des thérapies. Des études récentes décrivent ainsi de nouvelles interactions avec des voies de signalisation dans le carcinome épidermoïde (Wang, Gao et al. 2020) où elle interagit avec IGFBP3 pour perturber sa liaison avec les intégrines, ce qui empêche la phosphorylation de FAK et par conséquent inhibe la voie FAK-SRC-STAT, responsable des effets anti-tumoraux observés. Une autre étude décrit son implication dans les mécanismes médiés par la molécule sulindac sulfide, un anti-inflammatoire non stéroïdien, dans le cancer colorectal qui induit un arrêt de prolifération de ces cellules, en diminuant d'abord le niveau d'expression du miR-182, suivie d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de FOXO3a et l'augmentation du niveau

d'expression de CCNG2 (Zhao, Yi et al. 2020). Dans le carcinome laryngé, une étude de 2015 a pu identifier un axe miR-93/CCNG2 responsable de la progression de la maladie, avec une inhibition directe de CCNG2 par miR-93 (Xiao, Zhou et al. 2015).

# III.1.7 Les protéines kinase C

Les protéines kinases Calcium-dépendantes (PKCs) sont des sérines/thréonines kinases impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la survie, la différenciation, la motilité ou la prolifération (Griner and Kazanietz 2007) via la transduction de signaux membranaires et le contrôle de l'expression de gènes (Tanaka and Nishizuka 1994, Nalefski and Newton 2001). Ces protéines sont divisées en 3 sous-classes en fonction des messagers secondaires nécessaires à leur activation : les PKCs classiques, les nouvelles PKCs et les PKCs atypiques (Nishizuka 1995). L'ensemble des PKCs présente un domaine catalytique en carboxy-terminal (C-ter) et un domaine régulateur en amino-terminal (N-ter). Ces deux domaines sont séparés par une région appelée hinge (H) qui a la particularité de présenter des sites sensibles à la protéolyse.

Les **PKCs classiques** comprennent les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ **I**,  $\beta$ **II et**  $\gamma$ . Elles nécessitent du calcium (Ca<sup>2+</sup>), du diacylglycérol (DAG) et des phospholipides pour leur activation.

Les **nouvelles PKCs** qui comportent les PKCs  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  et  $\theta$  nécessitent elles aussi du DAG mais pas de Ca<sup>2+</sup> pour leur activation.

Les **PKCs** dites **atypiques** sont représentées par les PKCs  $\zeta$  et  $I/\lambda$ . Elles ont la particularité de ne pas être activables par du DAG ou du Ca<sup>2+</sup> : leur activation dépend d'interactions avec d'autres protéines.



Figure 24 : Structure des PKCs d'après (Garg, Benedetti et al. 2014).

Le rôle des différentes PKCs dans la pathogénie du cancer est incroyablement complexe. En effet, cette famille de protéines présente de nombreuses voies d'activation, régule de nombreuses voies de signalisations et leur implication semble très contexte spécifique. Par exemple dans le cas des hémopathies malignes, PKC  $\delta$  présente un rôle anti-apoptotique via l'activation de la voie PI3K (Ringshausen, Schneller et al. 2002) et la stabilisation de Mcl-1 (Baudot, Jeandel et al. 2009) dans la Leucémie Lymphoïde Chronique (CLL) alors qu'il joue un rôle pro-apoptotique dans le contexte de la LAM où son expression induit l'activation de Caspase-3 (Jang, Lim et al. 2004).

Cependant, il a été démontré dans de nombreux cancers une augmentation de l'expression de certaines isoformes par exemple dans les cancers du poumon (Bae, Wang et al. 2007), des ovaires (Nanos-Webb, Bui et al. 2016), du système digestif (Blay, Astudillo et al. 2004), du sein (O'Brian, Fan et al. 1989) ou encore du cerveau (Sharif and Sharif 1999). Toutefois, le lien entre le niveau d'expression des PKC et la transformation maligne des cellules n'est pas totalement démontré à ce jour. Il semblerait ainsi que les gènes codant pour les PKCs soit bien distincts des oncogènes ou proto-oncogènes traditionnels dans le sens où les mutations des gènes PKCs n'aboutissent pas à une transformation maligne des cellules, mais le rôle prépondérant des PKCs dans les processus cellulaires pourrait leur conférer un rôle collaboratif avec des oncogènes.

Ainsi, dans la plupart des types de cancer où Les isozymes PKC se retrouvent surexprimées celles-ci peuvent être utilisées comme cibles diagnostiques ou thérapeutiques.

Concernant la PKCδ on retrouve également cette dualité entre fonction oncogénique et fonction anti-tumorale selon les types de cancer (Basu and Pal 2010).

En ciblant la PKC $\delta$  en fonction de sa localisation sub-cellulaire (cytoplasme, réticulum endoplasmique, mitochondrie ou noyau) il a pu être démontré qu'elle pouvait avoir des rôles très différents sur les mécanismes apoptotiques (Gomel, Xiang et al. 2007). Il a ainsi été suggéré que son emplacement sub-cellulaire pouvait lui conférer l'opportunité de s'associer ou de réguler des acteurs des voies apoptotiques ou anti-apoptotiques localisés dans chacun de ces compartiments sub-cellulaires (Basu and Pal 2010). De la même manière, la PKC $\delta$  va s'associer à différents acteurs des voies de signalisation selon sa localisation sub-cellulaire ce qui peut également lui dicter son rôle dans la cancérogénèse. Dans les cellules de cancer de la vessie l'activation de la PKC $\delta$  conjointement à celle de la kinase N-terminale c-Jun (JNK) va entraîner l'épuisement des facteurs de croissance, contribuant à la réduction des adhérences cellule-cellule et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Chen, Lin et al. 2009). L'expression de PKC $\delta$  a également été associée à l'apoptose des cellules cancéreuses de la prostate. Le rôle pro-apoptotique de la protéine tyrosine-phosphatase PTPL1 dans les cellules cancéreuses PC3 et LNCaP est dépendant de PKC $\delta$  et induit une inhibition de la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  maintenant NF- $\kappa$ B inactif (Castilla, Chinchon et al. 2013).

Dans le contexte de la LMC, BCR-ABL est capable de réguler la voie des PKCs, en particulier via l'activation des PKCs  $\beta$ , I et  $\delta$  (Goldman and Druker 2001, Gustafson, Ray et al. 2004, Xenaki, Pierce et al. 2004).

Plusieurs tentatives ont pu émerger pour développer des inhibiteurs plus spécifiques des PKC et notamment de PKCδ.



# Figure 25 : Structures de la staurosporine, de la rottlerin et des dérivés de deuxième (KAM1) et de troisième (BJE6-106) génération d'après (Chen, Forman et al. 2011).

L'équipe de Douglas V Faller a développé de nouveaux inhibiteurs de PKCō avec une meilleure spécificité pour cette isoforme par rapport aux inhibiteurs de PKC disponibles sur le marché en utilisant une stratégie de pharmacophore modeling and structure-activity relationships (SAR) (Chen, Forman et al. 2011). Cette stratégie a permis de générer plusieurs analogues de deuxième et de troisième génération. La synthèse de ces inhibiteurs de deuxièmes et troisièmes générations de PKCo repose sur l'association de la portion carbazole de la staurosporine (responsable d'une inhibition globale des PKC) avec les domaines cinnamate side chain et benzopyran conservés de la rottlerin (pour conserver la spécificité via PKCδ). Un de ces inhibiteurs néosynthétisés les plus prometteurs fut la molécule KAM1, qui tout comme la staurosporine est très efficace pour induire la mort cellulaire de cellules cancéreuses in vitro et in vivo avec une très faible cytoxicité sur lignés non -transformées, mais avec une spécificité beaucoup plus importante pour l'inhibition de PKCo par rapport à la staurosporine (Chen, Forman et al. 2011). Toutefois, ces molécules présentent une structure très hydrophobe associée à des problèmes de solubilité, ce qui complique notamment leur utilisation in vivo via une infusion continue. Le développement subséquent de nouvelles molécules inhibitrices de PKCo de 3<sup>ème</sup> génération et ultérieures vise donc à diminuer cette hydrophobicité et à améliorer leur solubilité. Le BJE6-106 (BJE6), molécule de 3ème génération, a démontré son efficacité anti-tumorale dans plusieurs pathologies cancéreuses comme le mélanome pour lequel des lignés cellulaires portant des mutations de KRAS sont sensibilisées à l'apoptose par l'inhibition spécifique de la protéine kinase C delta (PKCS) (Takashima, English et al. 2014) mais également de manière plus intéressante dans un contexte de CSCs

pour cibler des cellules primaires humaines d'adénocarcinome pancréatique et prostatique (Chen, Forman et al. 2014).

# III.2 Métabolisme énergétique des Cellules Souches Leucémiques

Le métabolisme cellulaire est l'un des aspects les plus étudiés depuis une dizaine d'années en cancérologie où son altération/reprogrammation semble constituer un facteur commun à tous les types de cancers (Hanahan and Weinberg 2011). Il représente l'ensemble des réactions biochimiques de synthèses (anabolisme) et de dégradations (catabolisme) au sein d'une cellule conduisant à la production ou à la perte d'énergie et permettant la synthèse de molécules complexes à partir de molécules plus simples et inversement. Il est essentiel pour tous les processus cellulaires tels que la prolifération, la quiescence, la différenciation ou encore la division cellulaire. L'ensemble du métabolisme cellulaire connu répertorié à ce jour Encyclopedia Genes Genomes par la Kyoto of and (KEGG) (https://www.genome.jp/kegg/pathway.html#metabolism) représente plus de 8700 réactions biochimiques impliquant plus de 16 000 métabolites (DeBerardinis and Thompson 2012). Le métabolisme peut toutefois être simplifié en plusieurs voies de signalisations majeures qui comprennent la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, la voie d'oxydation des acides gras, la glutaminolyse ou encore le métabolisme mitochondrial. Je développerai ici les altérations de ces voies métaboliques au bénéfice des cellules cancéreuses (Figure 26).



**Figure 26 : Vue d'ensemble des adaptations métaboliques des cellules cancéreuses** d'après (Martinez-Outschoorn, Peiris-Pages et al. 2017). *ATP, adenosine triphosphate; BP, bisphosphate (or bisphospho); CoA, coenzyme A; GLUT1/GLUT4, glucose transporter 1/4; MCT1, monocarboxylate transporter 1; MCT4, monocarboxylate transporter 4; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide (reduced); NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (or phospho); SLC1A5, solute carrier family 1 member 5 (also known as neutral amino acid transporter B(0)).* 

# III.2.1 La Glycolyse

Une des premières altérations métaboliques identifiées au niveau des cellules cancéreuses est l'augmentation de la prise de glucose, cette dernière étant nécessaire pour satisfaire leurs besoins en macromolécules et en énergie. Le glucose est transformé au cours de la glycolyse en pyruvate après une succession de plusieurs réactions d'oxydoréduction catalysées par des enzymes. Le Dr. Otto Warburg observa ainsi dès le début du 20ème siècle pour la première fois que les cellules cancéreuses favorisaient l'utilisation de la glycolyse en normoxie, contrairement aux cellules normales (Warburg, Wind et al. 1927, Warburg 1956) : on appelle ce phénomène la **glycolyse aérobie** ou l'**effet Warburg**.

La glycolyse se déroule dans le cytoplasme à partir d'une molécule de glucose qui est convertie en 2 molécules de pyruvate, deux molécules d'ATP et deux Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit (NADH). En absence d'oxygène, la **glycolyse** est dite **anaérobie** et le pyruvate reste dans le cytoplasme où il est transformé en acide lactique, portant le bilan énergétique de la glycolyse à 2 ATP par molécule de glucose transformée. Le même bilan est observable lors de l'effet Warburg, où malgré la présence d'oxygène la cellule cancéreuse forme préférentiellement deux molécules d'acide lactique au lieu de deux pyruvates.

Toutefois, en milieu aérobie, le pyruvate rentre dans la mitochondrie où sa transformation se poursuit. De plus, les 2 NADH sont oxydés en Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) ce qui permet de récupérer 6 molécules d'ATP (3 ATP par NADH oxydé). Ainsi le bilan de la glycolyse en milieu aérobie est de 8 ATP au total alors que celui de la glycolyse anaérobie de seulement 2 ATP.

La conversion finale du glucose en pyruvate en condition normoxie permet la production de molécules d'ATP dont le nombre peut être légèrement modifié en fonction du recyclage du NADH+H<sup>+</sup> par la navette malate-oxaloacétate (38 ATP) ou la navette glycérol-3-phosphate (36 ATP). Les autres saccharides tels que le fructose ou le galactose empruntent également la glycolyse.

Ainsi, on peut se demander pourquoi la cellule cancéreuse favoriserait l'effet Warburg qui produit sensiblement moins d'ATP pour une molécule de glucose par rapport à la glycolyse en normoxie. La réponse à cette question peut trouver son origine dans le fait que la production d'ATP n'est pas le facteur limitant la prolifération des cellules cancéreuses. Effectivement, il a été démontré que les cellules cancéreuses, qu'elles utilisent la phosphorylation oxydative ou la glycolyse aérobie, peuvent produire et consommer la même quantité d'ATP (Christofk, Vander Heiden et al. 2008). De plus, les cellules cancéreuses, en plus d'avoir un besoin accru en énergie, présentent également des besoins conséquents en lipides, acides aminés ou encore nucléotides pour soutenir l'importante croissance de leur biomasse liée à leur prolifération : le glucose permet effectivement de produire de l'ATP mais également des précurseurs pour d'autres voies de synthèses (amino-acides, nucléotides et lipides). Dans ce contexte, le glucose représente un élément essentiel pour fournir en quantités importantes des

électrons et du carbone aux cellules cancéreuses. Ainsi, le glucose n'est pas systématiquement totalement catabolisé en ATP via la phosphorylation oxydative (OXPHOS), il peut être par exemple partiellement catabolisé pour fournir des précurseurs tels que trois acétyl-CoA via la glycolyse anaérobie. (Vander Heiden, Cantley et al. 2009). De plus, l'effet Warburg semble conférer un autre avantage conséquent aux cellules cancéreuses dans la mesure où l'inhibition de la glycolyse en normoxie diminue leur prolifération cellulaire mais déclenche également des processus apoptotiques (Bonnet, Archer et al. 2007).

Les CSHs utilisent la glycolyse comme principale voie énergétique, elles maintiennent ainsi un niveau glycolytique très élevé pour maintenir leur statut énergétique, ce qui limite la production de Reactive Oxygen Species (ROS), dont l'accumulation entraine des mutations et est délétère pour ces dernières. La MO présente un gradient en oxygène qui varie de 6 % au niveau des cavités sinusoïdales et jusqu'à 1 % dans les niches hypoxiques (Eliasson and Jonsson 2010). Ainsi, un changement important dans la composition du microenvironnement médullaire affectant par exemple la balance redox peut profondément altérer la fonction des CSHs. (Takubo, Nagamatsu et al. 2013, Mantel, O'Leary et al. 2015).

De manière intéressante, le travail de Lagadinou et al a permis la démonstration de l'existence d'une hétérogénéité métabolique au sein des CSL dans la LAM (Lagadinou, Sach et al. 2013). En effet, les CSLs, d'un point de vue fonctionnel, sont très similaires à leurs homologues normales et en particulier elles sont capables de moduler leur métabolisme pour adopter un état de quiescence, leur permettant ainsi de survivre aux conditions environnementales très stringentes imposées par le microenvironnement médullaire. Dans de telles conditions, les nutriments et l'oxygène ne sont pas disponibles *ad libitum*, ce qui impose aux CSH d'utiliser la glycolyse comme principale source d'énergie pour générer de l'ATP (Takubo, Nagamatsu et al. 2013)

Toutefois, il est désormais clairement établi que les altérations métaboliques que présentent les cellules cancéreuses ne se limitent pas à l'effet Warburg.

# III.2.3 La voie d'oxydation des acides gras (β-oxydation)

La β-oxydation est un processus catabolique qui permet à la cellule de produire de l'énergie à partir de la dégradation des acides gras. Les acides gras sont d'abord dégradés sous formes d'acides gras libres qui empruntent la circulation sanguine et rentrent dans les mitochondries des cellules via des transporteurs. Cette voie métabolique permet de générer de l'acétyl-Coa qui va alimenter le TCA cycle au niveau de la mitochondrie. Elle permet de produire de très

importantes quantités d'énergies : à titre d'exemple l'oxydation d'une molécule de palmitate permet la génération de 129 molécules d'ATP (Carracedo, Cantley et al. 2013).

Dans la LMC, une sous-population de CSLs a été démontrée capable d'exacerber la βoxydation à son bénéfice en important des acides gras libres via le transporteur CD36 dans un microenvironnement adipeux (Ye, Adane et al. 2016).

### III.2.4 La glutaminolyse

La glutaminolyse est la réaction métabolique de dégradation de la glutamine en glutamate. Cette voie se situe à un carrefour important métabolique qui permet par exemple l'utilisation de la glutamine pour la synthèse d'acides nucléiques, celle du glutamate pour former le glutathione (GSH) afin de lutter contre le stress oxydatif ou encore pour maintenir la fonctionnalité d'un TCA cycle en activité intense.

Le ciblage de la glutaminolyse a pu démontrer son intérêt dans les hémopathies malignes et en particulier dans la LAM. En effet, la glutamine est essentielle pour les processus de biosynthèses des cellules cancéreuses et leur confère une grande adaptabilité métabolique. L'inhibition de la conversion de la glutamine en glutamate par ciblage génétique ou pharmacologique de l'enzyme GLS1 s'accompagne d'une diminution de l'OXPHOS associée à un arrêt de prolifération et à un déclenchement des processus apoptotiques mitochondriaux. De manière intéressante, l'inhibition pharmacologique de GLS1 avec le CB-839 permet de sensibiliser les cellules leucémiques à un inhibiteur spécifique de BCL-2, l'ABT-199 et ces deux molécules synergisent au niveau apoptotique pour induire la mort cellulaire des cellules leucémiques. (Jacque, Ronchetti et al. 2015). Dans une autre étude, l'équipe de Mark A. Gregory et al a pu démontrer que l'inhibition de la voie de la glutamine par le CB-889 provoquait une accumulation de ROS mitochondriaux (mitoROS) accompagnée d'une sensibilité accrue de lignées cellulaires ou de cellules de patients à des molécules perturbant l'équilibre oxydatif telles que l'homoharringtonine (HHT) ou l'arsenic trioxide (ATO) (Gregory, Nemkov et al. 2019).

### III.2.5 La voie des pentoses phosphates

La fonction essentielle de la voie des pentoses phosphates (PPP) est la génération d'un potentiel d'oxydo-réduction au niveau de la cellule en convertissant le NADP+ en sa forme réduite NADPH, ce qui permet la synthèse de biomolécules et la protection les cellules contre le stress oxydatif (Kruiswijk, Labuschagne et al. 2015).

Cette voie permet de fournir aux cellules cancéreuses de nombreux précurseurs importants pour la synthèse de nucléotides et d'acides nucléiques comme le ribose-5-phosphate. De plus, certains intermédiaires de cette voie peuvent emprunter la voie glycolytique.

Les enzymes de cette voie sont des cibles intéressantes en cancérologie parce que leur ciblage pourrait induire une augmentation de la génération de ROS associée à des dommages à l'ADN.

Dans la LAM, une surexpression des gènes importants de cette voie tels que G6PD, PFKL ou encore PGLS est observée chez environ 61 % des patients sans qu'elle soit associée à un mauvais pronostic. L'inhibition de la voie PPP par approche pharmacologique avec le 6-aminonicotinamide (6AN) permet d'augmenter l'oxydation du glucose et d'inhiber la croissance, la migration et l'invasion des cellules de LAM (Chen, Xu et al. 2016).

# III.2.2 Le métabolisme mitochondrial

La mitochondrie est une organelle présente dans la très grande majorité des cellules (elle est rare ou absente dans les érythrocytes). Sa fonction principale est la production d'énergie cellulaire sous forme d'ATP à travers la chaîne respiratoire ou le cycle de Krebs. Le rôle des mitochondries ne se limite pas à fournir l'essentiel de l'énergie aux cellules : elles sont également impliquées dans la signalisation cellulaire comme la mort des cellules, le cycle cellulaire ou encore la différenciation.

# II.2.2.1 La phosphorylation oxydative (OXPHOS) et le cycle de Krebs (TCA cycle)

La phosphorylation oxydative (OXPHOS) ou chaîne respiratoire est composée de 5 transporteurs dont le rôle est de réaliser un transfert d'électrons par une série de réactions d'oxydo-réduction avec l'oxygène comme accepteur final pour générer de l'énergie sous la forme de synthèse de molécules d'ATP : l'OXPHOS est le principal générateur d'ATP au niveau de la cellule. Cette réaction a lieu dans la membrane interne mitochondriale.

Le cycle de Krebs ou TCA cycle est l'étape métabolique finale des voies de signalisation qui nécessite de l'oxygène comme la voie des acides aminés, des acides gras ou des carbohydrates. Le TCA cycle joue un rôle primordial dans la synthèse d'énergie et notamment en fournissant du NADH et du FADH2 qui sont indispensable pour le fonctionnement optimal de l'OXPHOS.

Le travail de Lagadinou et al a pu identifier que la plupart des CSLs fonctionnelles présentent un très faible niveaux de ROS corrélé à une surexpression du membre anti-apoptotique BCL2 Ces CSLs dites ROS-low, contrairement aux CSH, ne favorisent pas la glycolyse pour leurs besoins énergétiques mais plutôt l'OXPHOS, dont elles semblent très dépendantes, leur glycolyse étant insuffisante pour assurer leurs besoins énergétiques (Lagadinou, Sach et al. 2013). L'inhibition spécifique du membre anti-apoptotique BCL2 avec la molécule ABT-263 diminue drastiquement leur OXPHOS et induit leur mort cellulaire, confirmant leur incapacité à utiliser la glycolyse pour s'adapter métaboliquement et survivre (Lagadinou, Sach et al. 2013), suggérant l'importance des processus mitochondriaux pour ces cellules et donc l'efficacité d'une stratégie visant à bloquer ces processus (Cole, Wang et al. 2015, Sriskanthadevan, Jeyaraju et al. 2015). Cette dépendance à l'OXPHOS des CSLs ROS-low semble paradoxale étant donné qu'une utilisation intensive de la chaîne respiratoire génère beaucoup de ROS, mais pourrait s'expliquer par le fait que de nombreuses voies métaboliques convergent vers l'utilisation de l'OXPHOS, davantage que pour la glycolyse, et cela pourrait conférer un avantage significatif sur le long terme à ces CSLs. Ces cellules pourraient également avoir développé un système de détoxification de ROS conséquent. Ce défaut de glycolyse, et donc cette préférence énergétique pour l'OXPHOS est également observée pour des cellules souches de gliome, suggérant ainsi qu'il pourrait s'agir d'une caractéristique commune à plusieurs cellules souches cancéreuses de manière générale à travers différents cancers (Vlashi, Lagadec et al. 2011).

Une autre étude dans la LAM met en évidence une dépendance accrue des CSLs au métabolisme des acides aminés qui se traduit par une augmentation du nombre d'intermédiaires métaboliques importants pour l'OXPHOS et la survie de ces cellules. Le ciblage de cette augmentation de prise d'acides aminés avec le vénétoclax et l'azacitidine diminue l'OXPHOS et induit la mort cellulaire des CSLs. (Jones, Stevens et al. 2018).

Dans la LMC, une étude fondamentale a pu mettre en évidence dès 2017 la tendance des CSLs à favoriser l'OXPHOS pour satisfaire leurs besoins énergétiques par rapport aux CSHs. Le ciblage de l'OXPHOS par la tigecycline avec l'Imatinib permet d'éradiquer sélectivement les CSLs (Kuntz, Baquero et al. 2017).

### **II.2.2.2 Les cardiolipines**

Les cardiolipines (CL) sont des lipides essentiels pour la structure, la fonction et les voies de signalisations mitochondriales. Les CL sont présentes en grand nombre au sein des mitochondries et sont très exprimées par exemple au niveau des cellules cardiaques qui

présentent une haute activité métabolique (riches en mitochondries) comme les cardiomyocytes contractiles.



**Figure 27 : Biosynthèse et remodelage des cardiolipines** d'après (Dudek 2017). *A) Le processus de biosynthèse des cardiolipines (CL) se déroule dans la membrane interne de la mitochondrie (IM). La topologie membranaire des enzymes impliquées dans ce processus sont indiquées sur le schéma. Les structures des précurseurs des CL sont montrées dans le panel du bas. Les numéros des réactions enzymatiques correspondent avec les enzymes indiquées dans le panel du bas. Les numéros des réactions enzymatiques correspondent avec les enzymes indiquées dans le panel du haut. B) Les CL sont remodelées après leur synthèse initiale. La phospholipase impliquée dans ce processus n'est toujours pas identifiée à l'heure actuelle. La protéine Tafazzin est localisée dans l'espace intermembranaire (IMS) et est associée à la fois à IM et à la membrane externe (OM). OM : outer membrane, IM : inner membrane, IMS : intermembrane space, pCL : premature cardiolipin, mCL : mature cardiolipin.* 

Les CL sont synthétisées dans la mitochondrie à partir de l'acide phosphatidique selon une réaction en 4 étapes, et nécessitent par la suite une étape de maturation avant d'être fonctionnelles.

Une fois fonctionnelles, les CL jouent une multitude de rôles essentiellement au niveau mitochondrial : elles sont capables d'influencer la structure mitochondriale en structurant les crêtes (Boyd, Alder et al. 2018) ou en participant à la formation sites de contact entre membrane mitochondriale interne et externe (Ardail, Privat et al. 1990). De plus, elles favoriseraient les réactions métaboliques impliquant l'OXPHOS (Mileykovskaya, Zhang et al. 2005). Elles jouent aussi le rôle de plateformes de signalisation pour recruter des partenaires apoptotiques comme Bax, tBid ou encore la Caspase-8. (Dudek 2017).

Toutefois, ces mécanismes impliquant les CL ne sont à l'heure actuelle que peu caractérisés et mériteraient certainement une plus grande attention à la vue de leur importance au niveau mitochondrial, et en particulier au niveau des pathologies cancéreuses où elles pourraient jouer un rôle crucial.

# **Objectifs**

### Thématique du groupe de recherche

Notre équipe de recherche s'intéresse à la compréhension des mécanismes de la leucémogenèse. La meilleure compréhension de ces mécanismes vise l'identification de nouvelles cibles moléculaires et leur ciblage par différentes stratégies pharmacologiques. De façon plus globale, les centres d'intérêts concernent l'identification de nouvelles molécules capables d'activer ou d'inhiber spécifiquement des mécanismes permettant l'éradication des CSLs insensibles/résistantes aux ITKs.

### Projet de thèse

Dans ce contexte, mon projet de thèse consistait à évaluer l'efficacité de deux nouvelles approches pharmacologiques au niveau du compartiment souche leucémique dans la LMC.

1- Dans une première approche, je me suis intéressé au rôle de la PKCδ dans la LMC et à l'intérêt de la cibler au moyen d'un inhibiteur spécifique le BJE6-106 (BJE6), en collaboration avec l'équipe du Dr Douglas Faller.

Ces travaux font l'objet d'une publication soumise dans la revue Cancers et intitulée : « Combination of PKCδ Targeting with conventional TKI treatment as full therapeutic option in CML ».

2- Dans une deuxième approche, j'ai étudié le mode d'action d'une molécule de la famille des bisbiguanides, l'Alexidine (ALX) précédemment identifiée par une approche bio-informatique.

Les résultats sont présentés ci-après sous la forme de figures.

# Objectif 1 : Agir sur la leucémogénèse en ciblant l'Axe BCR-ABL-PKCδ-BMI1.

## A-Présentation de l'étude et résumé.

Le répresseur transcriptionnel BMI1 est décrit depuis de nombreuses années pour être impliqué dans le maintien et l'auto-renouvellement des cellules souches leucémiques. Cet oncogène a également été trouvé surexprimé dans de nombreux types de cancer. Dans la Leucémie Myéloïde Chronique, son niveau d'expression varie avec l'état d'avancement de la maladie (Bhattacharyya, Mihara et al. 2009) et nous avions précédemment rapporté qu'il pouvait également varier en fonction de son traitement (Mourgues, Imbert et al. 2015). Le lien direct entre BCR-ABL et BMI1 a été rapporté avec l'expression ectopique de BCR-ABL dans des cellules HEK-293 corrélée à une forte activation transcriptionnelle de *BMI1* (Bhattacharyya, Mihara et al. 2009)

Cependant, le mode de régulation de BMI1 est encore peu documenté bien que quelques pistes soient décrites au niveau transcriptionnel, notamment avec le miR 200c/141 (Dimri, Kang et al. 2016) et du facteur de transcription Sall4 (Yang, Chai et al. 2007).

BCR-ABL, de par son activité kinase constitutive, active de nombreuses kinases dont certaines appartenant à la famille des PKC ( $\beta$ , I,  $\delta$ ) (Kin, Shibuya et al. 2001, Gustafson, Ray et al. 2004, Xenaki, Pierce et al. 2004).

Par ailleurs l'implication de la PKCδ dans le maintien des cellules souches cancéreuses a été décrit dans le cancer du poumon (Lee, Fang et al. 2018) et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de cette PKC ont permis de resensibiliser les cellules souches cancéreuses aux ITKs dirigés contre l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR).

Dans cette première approche, je me suis consacré à caractériser les effets moléculaires dans la LMC d'un inhibiteur spécifique de la PKCδ, le BJE6-106 (BJE6), en collaboration avec l'équipe du Dr Douglas V Faller. Cette étude a été conduite sur différentes lignées de LMC ainsi que sur des cellules CD34+ isolées à partir de prélèvements médullaires réalisés chez des patients atteints de LMC.

**B-** Article soumis pour publication Cancers.





1 Article

# Combination of PKCδ Targeting with conventional TKI treatment as full therapeutic option in CML<sup>+</sup>

4 Fabien Muselli<sup>1</sup>, Lucas Mourgues<sup>1</sup>, Rita Morcos<sup>1</sup>, Nathalie Rochet<sup>2</sup>, Marielle Nebout<sup>1</sup>, Agnès

5 Guerci<sup>3</sup>, Douglas V Faller<sup>4</sup>, Rana Mhaidly<sup>1</sup>, Els Verhoeyen<sup>1</sup>, Laurence Legros<sup>5</sup>, Jean-François 6 Bouron<sup>1</sup><sup>8</sup> and Didior Maru<sup>1</sup><sup>8</sup>\*

- 6 **Peyron**<sup>1,§</sup> and Didier Mary<sup>1,§,\*</sup>
- 7 <sup>1</sup> Université Côte d'Azur, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065, Centre

8 Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Team 4, CEDEX 3, 06204 Nice, France;

- 9 fabien.muselli@univ-cotedazur.fr (F.M.); lmourgues@unice.fr (L.M); rita-morcos@hotmail.com (R.M.);
- 10 marielle.nebout@univ-cotedazur.fr (M.N.); rana.mhaidly@univ-cotedazur.fr (M.R.);
- 11 els.verhoeyen@univ-cotedazur.fr (E.V.); jean-francois.peyron@univ-cotedazur.fr (J-F.P.);
- 12 didier.mary@univ-cotedazur.fr (D.M.)
- 13 <sup>2</sup> Université Côte d'Azur, Institut de Biologie Valrose, CNRS UMR 7277, Inserm U1091, 06107 Nice cedex 02,
- 14 France; nathalie.rochet@univ-cotedazur.fr (N.R.)
- 15 <sup>3</sup> Hematology department, University Hospital, Nancy, France; a.guerci@chru-nancy.fr (A.G.)
- 16 <sup>4</sup> Oncology Clinical Research, Millennium Pharmaceuticals Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, MA, 02139,
- 17 USA; dfaller@bu.edu (D.F.)
- 18 <sup>5</sup> Department of Hematology, Hôpital Paul Brousse, Créteil, France; laurence.legros@aphp.fr (L.L.)
- 19 \* Correspondence: didier.mary@univ-cotedazur.fr
- 20 § These authors share senior coauthorship
- 21 + Dedicated to Robert M Williams recently deceased
- 22
- 23
- 24 Received: date; Accepted: date; Published: date
- 25

26 Simple Summary: The tyrosine kinase inhibitor (TKI) imatinib was the first targeted therapy to 27 show clinical efficiency on Chronic Myeloid Leukemia (CML) through inhibition of the BCR-ABL 28 oncogene that is responsible for the disease. Two other generations of TKIs have succeeded 29 imatinib, offering additional therapeutic solutions to a growing number of CML patients. These 30 clinical approaches although very effective, generate many unwanted side effects because of their 31 daily administration. Attempts to stop TKI treatment when the disease was no longer detectable at 32 the molecular level unfortunately resulted in relapses in more than half of the cases highlighting the 33 presence of undetectable leukemia cells insensitive to TKI during treatments recognized as 34 Leukemic Stem Cells (LSCs) that are TKI insensitive. It appears therefore necessary to identify new 35 biochemical pathways in CSLs, the targeting of which would make it possible to re-sensitize these 36 resistant cells to TKIs. The results presented here demonstrates that targeting the Protein Kinase 37 Cδ (PKCδ) pathway represents a valid alternative treatment option for LSC elimination.

38

39 Abstract: Numerous combinations of signaling pathways blockage in association with TKI treatment were already proposed in a goal to eradicate Leukemic Stem Cells (LSCs) in CML but none of them is currently available for clinical treatment. Because PKCδ targeting was demonstrated to allow Cancer Stem Cells (CSCs) elimination in solid tumors, we evaluated here the affining a of BKCδ inhibition in combination with TKI on CML cells.

- 43 efficiency of PKC $\delta$  inhibition in combination with TKI on CML cells.
- 44 We observed that pharmacological targeting of PKCδ, silencing of its gene expression or engineered
- 45 inducible K562 cells expressing dominant negative (DN) or constitutive active (CA) constructs of
- 46 different PKCs clearly indicated that PKCδ regulated expression of the stemness regulator BMI1,
- 47 clonogenicity and leukemic cell proliferation. On the K562 and LAMA-84 CML cell lines, PKCδ

48 targeting was demonstrated to enhance the apoptotic response induced by any TKI of the three 49 generations, through flow cytometry, by TMRE evaluation of the mitochondrial membrane 50 potential and by Annexin V-DAPI staining. We also noted a strong synergism for the 51 combination-treated groups to increase Caspase-9, Caspase-3 and PARP cleavage and significantly decreased Bcl-xL family member expression. Pharmacological targeting of PKCδ didn't modified 52 53 BCR-ABL phosphorylation but acted downstream the oncogene by downregulating BMI1 54 expression leading to a drop in clonogenicity. PKCδ inhibition on primary CML CD34<sup>+</sup> cells from 55 diagnosed patients was as efficient than any TKI in inhibiting part of the clonogenicity while it did 56 not affect differentiation of healthy CD34<sup>+</sup> cells. Furthermore, the combined treatment strongly 57 inhibited CML-CD34<sup>+</sup> clonogenicity. BCR-ABL encoding lentiviral vector transduced healthy CD34<sup>+</sup> 58 cells indicated that PKCô inhibition specifically affected BCR-ABL-expressing cells. LTC-IC 59 experiments pinpointed out that PKCô inhibition strongly decreased the LSCs frequency. All 60 together, these results validate the targeting of PKCo in combination of a conventional TKI 61 treatment as a potential therapeutic solution to eradicate LSCs to durably cure CML patients.

62

Keywords: chronic myeloid leukemia; leukemic stem cells; tyrosine kinase inhibitors; apoptosis;
 BMI1; PKCδ

65

### 66 1. Introduction

67 The management of patients with CML totally changed with the implementation of tyrosine 68 kinase inhibitors (TKIs) to target the BCR-ABL oncogene that is responsible for the disease. Since 69 Imatinib the first TKI used [1, 2], two other generations of TKIs have succeeded, widening the 70 possibilities of treatment [3]. The different TKIs can be distinguished as mono or dual TKIs, the 71 second targeting both BCR-ABL and Src kinases [4-6]. Despite significant successes, still nearly half 72 of the treated patients with undetectable BCR-ABL levels for whom treatment was discontinued to 73 decrease side effects, experience a relapse of their leukemia [7]. A cure to CML is believed to be 74 achievable only after eradication of the persistent therapy-resistant cells in the body namely 75 leukemic stem cells (LSC) or leukemic initiating cells (LIC) [8, 9]. Numerous studies that emerged 76 during the last decade have demonstrated the necessity to specifically target LSCs/LICs in order to 77 prevent CML relapse [10].

Therefore, the only way to cure CML is probably to eliminate not only differentiated mature leukemia cells, leukemia progenitors, but most importantly LSCs. Indeed, it is well known that if the bulk of chronic myeloid leukemic cells is very sensitive to BCR-ABL inhibitors, CML LSCs do not dependent on BCR-ABL kinase activity to survive [11, 12]. If differentiated cells and progenitors can be targeted by TKI, molecules that specific target LSCs remain to be developed. As LSCs do not express specific antigens at their surface, most strategies have focused on the biochemical pathways that are crucial to LSCs [10].

The problem of persistent and insensitive primitive cancer stem cells (CSCs) associated with chemotherapy resistance and relapse is not restricted to hematological disorders. During the last decade, many studies have highlighted the potential to target the PKC family of kinases with several drugs under clinical trials [13].

89 The PKC family includes ten different isoforms, that display differential tissue expression and 90 even opposite biological effects depending on the cell type studied [14]. Interestingly, numerous 91 studies have shown the potential to target individual isoforms in a cancer-specific manner such as 92 PKCα in breast cancer [15] or PKCε in glioma [16]. The PKCδ isoform is ubiquitously expressed and 93 can have an anti-apoptotic role or conversely an oncogenic role depending on the cellular system 94 and apoptotic stimuli [17]. In this context, activators or inhibitors of PKC8 can represent anti-cancer 95 opportunities however, this depends on the type of cancer. Indeed, a PKC $\delta$  activator has been 96 proposed for colon cancer therapy [18] while a PKCS inhibitor induced more anti-cancer effects in 97 other solid tumors such as melanoma [19] or lung cancer [20]. Interestingly, survival of CSCs in

- 98 breast, prostatic, melanoma and pancreatic cancers was reported to decrease after PKCδ targeting99 [21].
- 100 Furthermore, it was recently reported that targeting PKCδ can resensitize CSCs to TKI101 response in EGFR-mutant lung cancer [20].
- 102 We developed here a similar strategy in order to eliminate persistent LSCs in primary CML
- 103 patient samples. We demonstrated that PKC $\delta$  inhibitors are able to first decrease the expression of
- BMI1, that is crucial for the self-renewal of LSCs, and subsequently to sensitize both proliferative
- $105 \qquad \text{and quiescent CML CD34}{}^{\scriptscriptstyle +} \text{ cells to all clinically available TKIs}.$

### 106 **2. Results**

107 2.1. PKCδ inhibition synergizes with Tyrosine Kinases Inhibitors (TKI) to decrease proliferation and
 108 clonogenicity of CML cells.

In order to appreciate the role of PKCδ in CML we compared different PKC inhibitors for their
 effect on proliferation (Figure 1A to 1C) and clonogenicity (Figure 1D) of the K562 CML cell line.

111  $5\mu$ M of GF109203X (GFX), that is a potent inhibitor for PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  and PKC $\gamma$ , or  $5\mu$ M of 112 Enzastaurin (ENZA) that inhibits PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\gamma$  and PKC $\varepsilon$ , didn't decrease neither 113 proliferation nor clonogenicity of K562 cells. 5µM of Sotrastaurin (SOTRA), that inhibits PKCô in 114 addition to other PKC isoforms (PKC0, PKCβ, PKCα, PKCη and PKCε), didn't affect 115 proliferation but decreased by 30% clonogenicity of K562 cells (Figure 1A). On the other hand, 1µM 116 of Rottlerin (ROTL), described to inhibit PKCô, allowed a 70% inhibition of proliferation and a 30% 117 inhibition of clonogenicity, while 5µM inhibited more than 90% of both biological events (Figure 1B 118 and 1D). Nevertheless, because Rottlerin was also described to target the mitochondrial respiratory 119 chain [22], we next used the more specific PKC<sup>8</sup> inhibitor, BJE6-106 (BJE6) [21]. BJE6 dose 120 dependently inhibited proliferation (50, 90% at 0.1 and 0.3µM) and clonogenicity (80, 90% at 0.1 and 121 0.3µM) of K562 cells (Figure 1C and 1D). We then examined the simultaneous effect of PKCb 122 inhibition and BCR-ABL targeting on K562 cells. We observed that 0.1µM of BJE6 combined with 123 1µM of imatinib (IMA) inhibited K562 cell proliferation by 70% while it was only decreased by 50% 124 when each drug was administrated independently (Figure 2A). Similar results were obtained with 125 the dual BCR-ABL/Src kinase inhibitor Dasatinib (DASA) (Figure 2B). Furthermore, combination of 126 BJE6 (0.3µM) with IMA (1µM) or DASA (2nM) totally abrogated K562 cell proliferation (Figure S1).



127

128 Figure 1. PKCô targeting inhibits proliferation and clonogenicity of K562 cells. Proliferation curves 129 of K562 cells treated for 48h with A) DMSO (CT), 5µM Enzastaurin (ENZA), 5µM GF109203X (GFX) 130 or 5µM Sotrastaurin (SOTRA). B) DMSO (CT), 1 or 5µM Rottlerin (ROTL). C) DMSO (CT), 0.1µM or 131 0.3µM BJE6-106 (BJE6). Time-lapse analysis of cells using the IncuCyte system. Graphs show 132 quantification of cell numbers from phase contrast confluence counting. Data are the mean ± SD (n = 133 3). \*\*\*\*, P < 0.0001, two-way ANOVA analysis, Tukey's multiple comparison. A.U., arbitrary unit. D) 134 Clonogenic analysis of K562 cells treated for 7 days with vehicle (CT), 5µM GF109203X (GFX), 5µM 135 Enzastaurin (ENZA), 5µM Sotrastaurin (SOTRA), 1 or 5µM Rottlerin (ROTL), 0.1 or 0.3 µM 136 BJE6-106 (BJE6). \*\*\*, P < 0.001, two-way ANOVA analysis. 137

138 A phase-contrast microscopy analysis at the end of a 48h-treatment period following addition 139 of BJE6 (0.1 $\mu$ M), IMA (1 $\mu$ M), DASA (2nM) or combinations of them, showed that drugs decreased 140 the cell numbers with the formation of apparent apoptosis vacuoles that were strongly increased at 141 24h (Figure S2) with a maximal effect at 48h (Figure 2C), by the addition of BJE6 with IMA or DASA. 142 In order to determine the possible synergistic effect of PKC $\delta$  and BCR-ABL inhibitions, we 143 performed dual drug combinations of BJE6 either with IMA or DASA at increasing concentrations. 144 We calculated synergy scores for each combination of doses using the SynergyFinder software and 145 the Highest Single Agent (HSA) Synergy score which represents the mean of all synergy scores. 146 The majority of combinations for IMA/BJE6 gave several high synergistic results with a HSA 147 Synergy score of 10.549 (Figure 2D) whereas DASA/BJE6 gave moderate synergies with a lower 148 HSA Synergy score of only 5.772 (Figure 2E). Individual Synergy score calculation allowed us to 149 identify the best synergy combinations inducing up to 80% of cell death, which were  $0.3\mu$ M BJE6 + 150 1µM IMA (Table 1) and 0.3µM BJE6 + 3nM DASA (Table 2), as visualized as red columns in 151 histograms (Figure 2D and 2E).





0.1

0





DASA (nM)

**BJE6** 

CT

Figure 2. PKC<sup>8</sup> targeting synergizes with TKIs to inhibit proliferation and induce cell death of K562 cells. A-B) Proliferation curves of K562 cells treated with DMSO (CT), 0.1µM of BJE6-106 (BJE6), 1µM of Imatinib (IMA), combination of BJE6 and IMA (Combo 1) or 2 nM Dasatinib (DASA), combination of BJE6 and DASA (Combo 2) for 48 hours. Time-lapse analysis of phase contrast K562 cells using the IncuCyte system. Graphs show quantification of cell numbers from phase contrast confluence counting. Data are the mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\* p < 0.001, 2-way ANOVA analysis. A.U. arbitrary unit. C) Observation of K562 cells stimulated as in A and B by phase-contrast microscopy (Zeiss Axiocam 305 color) 20X. Scale bar is 200 nm. D-E) Cell death 3D graphs (left panel) of K562 cells treated with indicated doses of BJE6, IMA or DASA after DAPI staining. Cell death is expressed as the percentage of control. The best synergy combinations inducing up to 80% of cell death are represented by the red histograms and were used for all others experiments. Synergy density plot displaying the distribution of synergy and dose-response matrix (right panel) of K562 cells after BJE6/TKI treatments. Combination scores are represented from green (antagonism) to red (strong synergy) following a color gradient. On the dose-response matrix, the % of cell death is represented following a color gradient from low to high cell death.

**Table 1.** Relative synergy of BJE6-106 (BJE6) and Imatinib (IMA) on K562 cells calculated from data obtained in

- 170 Figure 1D. The best relative synergy to obtained more than 80% of cell death is marked in bold.

[BJE6] µM	[IMA] µM	% of Cell death	<b>Relative Synergy</b>	Standard Deviation
0	0	0	0	0
0.1	0	24.74	0	12.23
0.3	0	61.95	0	0.56
1	0	96.36	0	0.61
0	0.1	18.98	0	9.98
0.1	0.1	29.11	5.325283	0.73
0.3	0.1	71.88	12.1007	8.41
1	0.1	96.56	0.24372	0.39
0	0.3	39.48	0	3.64
0.1	0.3	55	18.91267	4.63
0.3	0.3	70.98	11.00396	1.84
1	0.3	95.71	-0.79209	0.59
0	1	57.57	0	2.55
0.1	1	69.09	14.03827	1.36
0.3	1	81.28	23.55554	0.47
1	1	95.88	-0.58493	0.18

1//

- 185 Table 2. Relative synergy of BJE6-106 (BJE6) and Dasatinib (DASA) on K562 cells calculated from data obtained
- 186 in Figure 1D. The best relative synergy to obtained more than 80% of cell death is marked in bold.

[BJE6] µM	[DASA] nM	% of Cell death	<b>Relative Synergy</b>	Standard Deviation
0	0	0	0	0
0.1	0	22.45	0	7.18
0.3	0	65.86	0	4.01
1	0	95.74	0	0.55
0	0.1	13.97	0	7.27
0.1	0.1	35.04	14.92119	5.59
0.3	0.1	70.49	5.487299	0.86
1	0.1	96.15	0.485916	0.60
0	0.3	42.25	0	4.11
0.1	0.3	41.03	-1.4459	2.99
0.3	0.3	72.96	8.414648	2.29
1	0.3	95.36	-0.45036	0.68
0	1	52.48	0	10.10
0.1	1	54.95	2.92735	5.51
0.3	1	78.59	15.08711	4.65
1	1	95.1	-0.7585	1.13
0	3	60.97	0	8.02
0.1	3	64.47	4.148066	4.41
0.3	3	83.4	20.78774	4.20
1	3	94.6	-1.35108	0.89
0	10	65.76	0	6.63
0.1	10	60.09	-6.71987	2.80
0.3	10	82.12	19.27073	2.25
1	10	94.66	-1.27997	0.59

## 187

188

### 189 2.2. BCR-ABL controls BMI1 expression by stimulating PKC8 level in CML cells.

190 We previously reported that CML progression is associated with an increase in BMI1 191 expression without addressing the role of BCR-ABL in this process [23]. Analysis gene expression 192 profiling data from bone marrow CD34<sup>+</sup> cells confirmed a higher BMI1 expression in CML patients 193 compared to healthy donors (p=0.008) and this was associated with an increase in PKCô expression 194 (p=0.02) while PKCc decreased (p=0.004) (Figure 3A). We then observed that treatment of K562 cells 195 with BCR-ABL inhibitors IMA or DASA is associated with a drop in BMI1 expression (Figure 3B). 196 Accordingly, the PKCô inhibitor BJE6 (Figure 3B) as well as the silencing of PKCô by siRNA 197 decreased BMI1 expression (Figure S3). We then compared PKC $\delta$  to PKC $\varepsilon$ , another isoform of the 198 novel group of PKCs, by using doxycycline-inducible models of constitutive active (CA) and 199 dominant negative (DN) forms for both PKCs, in the A1-K562 cells previously described [23]. The 200 ectopic expression of the dominant negative (DN) isoforms of PKCa,  $\epsilon$  and  $\delta$ , in A1-K562 cells 201 treated with doxycycline (DOXY), showed that only PKCδ-DN decreased BMI1 expression (Figure 202 3C). Furthermore, induction of PKCδ-DN isoform expression also decreased both DNA synthesis 203 (Figure 3E) and metabolism (Figure 3F) of A1-K562 cells. Inversely, ectopic expression of 204 constitutive active isoform of PKCô (PKCô-CA) significantly increased both BMI1 expression 205 (Figure 3D) and A1-K562 cells clonogenicity compared to PKCE-CA (Figure 3G).





206 Figure 3. Expression of PKC<sup>8</sup> correlates with BMI1 expression in CML cells and controls 207 proliferation, metabolism and clonogenicity. A) BMI1, PKC& and PKCE expression profiling data 208 from bone marrow CD34+ cells in healthy donors and CML patients (GSE5550). B) K562 cells were 209 stimulated or not with BJE6 (1µM), IMA (1µM), DASA (2nM) or combination of BJE6 with any of 210 the TKIs. After 24 hours cell lysates were analyzed by BMI1 immunoblotting. C) A1-K562 were 211 stimulated by DOXY (1µg/ml) for 2 days for indicated DN-PKCs induction. Cell lysates were 212 analyzed by BMI1, PKCo and myc-Tag immunoblotting. D) A1-K562 were stimulated by DOXY 213 (1µg/ml) for 2 days for indicated CA-PKCs induction. Cell lysates were analyzed by BMI1 and 214 myc-Tag immunoblotting. E) DNA synthesis analysis of A1-K562 cells after induction of CA or DN

215PKCδ (BrdU immunoassay) by a 2-day treatment or not with DOXY. F) Metabolic activity of216A1-K562 cells after induction of CA or DN form of PKCδ (BrdU immunoassay) by a 2-day treatment217or not with DOXY. G) Clonogenic potential of A1-K562 cells after induction of CA form of PKCδ or218PKCε measured on cells seeded in methyl cellulose medium (3x10³ cells/ml) in the presence or not219of DOXY (1µg/ml). Colonies were counted after 7 days. Results are % of control ± SD of 3 different220determinations. Error bars represent SD for 3 biological replicates. \* p<0.05; Student's t test.</td>

### 221 2.3. The specific inhibition of PKC $\delta$ does not affect early steps of BCR-ABL pathway but stimulates apoptotic 222 mitochondrial process.

In order to understand how PKCô inhibition alters cell survival, in particular through its synergistic effect with the inhibition of BCR-ABL, we first compared the effect of IMA, DASA and BJE6 on the level of BCR-ABL phosphorylation and its direct targets, namely STAT-5 and CRKL. We observed that IMA and DASA alone promptly inhibited phosphorylation of both BCR-ABL, STAT5 and CRKL while BJE6 single treatment failed (Figure 4A). Furthermore, combination experiments with BJE6 did not significantly improve the effect of each TKI alone (Figure 4A). Similar results were obtained on the LAMA-84 CML cell line (Figure S4).

Because PKCδ inhibition seemed to induce apoptosis in CML cells (Figure 2C) we nextassessed the consequences of this inhibition at the mitochondrial level.

232 Addition of BJE6, IMA or DASA alone for 24 hours in K562 cell line decreased their 233 mitochondrial membrane potential (MMP) by 16%, 18% and 20% respectively (Figure 4B). 234 Furthermore, BJE6 enhanced the TKIs-induced mitochondrial depolarization by 2.6 for IMA and 235 2.37 for DASA in K562 cells, respectively (Figure 4B). Results obtained in LAMA-84 cells treated 24 236 hours with the same conditions confirmed the enhanced mitochondrial depolarization by 4.6 and 237 4.4 fold for respectively IMA and DASA (Figure S5A). After 48 hours BJE6 alone decreased the 238 MMP by 20% and combination treatments with any of the TKIs enhanced it up to 80% (Figure S6). 239 Similar results were obtained on the other CML cell line LAMA-84 (Figure S5B).

### 240 2.4. PKCδ inhibition synergistically enhances TKI-induced mitochondrial apoptosis events.

241 We next investigated the molecular apoptotic events under the same conditions by flow 242 cytometry after Annexin V/ DAPI staining and through Western blot analysis. Addition of BJE6, 243 IMA or DASA alone on K562 cells for 24 hours was associated with a slight increase of early 244 apoptotic events (Figure 4C) and a light cleavage of caspase 9, caspase 3 and PARP associated with a 245 small decrease in the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Mcl-1 (Figure 4D). All of 246 these events are greatly amplified when BJE6 was combined with IMA or DASA with a synergistic 247 early apoptosic events at 24h (Figure 4C) and late apoptotic events at 48h (Figure S7), consistent 248 with the modifications observed at the molecular level (Figure 4D). One can note that the expression 249 of another anti-apoptotic protein, Bcl-2, expressed in LAMA-84 cells behaved in the same way than 250 other anti-apoptotic molecules (Figure S8). Inhibition of PKC $\delta$  combined with the other available 251 TKIs, namely Nilotinib (NILO), Bosutinib (BOSU) and Ponatinib (PONA) led to the same effects on 252 K562 and LAMA-84 cells (Figure S9 and S10).



**Figure 4.** Combinations of PKC $\delta$  and BCR-ABL inhibitors induce apoptosis events in K562 cells. A) K562 cells were stimulated or not with 0.5 $\mu$ M of BJE6-106 (BJE6), 1 $\mu$ M of Imatinib (IMA), 2nM of Dasatinib (DASA) or combinations for 15 minutes. Cell lysates were analyzed by immunoblotting for indicated proteins. B) K562 cells were stimulated or not with 0.5 $\mu$ M of BJE6-106 (BJE6), 1 $\mu$ M of imatinib (IMA), 2nM of Dasatinib (DASA) or combinations for 24 hours. After 15 min of TMRE staining (200nM), cells were analysed by flow cytometry (Left panel). Quantification of mitochondrial depolarization \*\*\*\* p < 0.0001, 2-way ANOVA analysis (Right panel). C) K562 cells

were stimulated or not with 0.5 $\mu$ M of BJE6-106 (BJE6) in combination or not with 1 $\mu$ M of Imatinib (IMA) or 2nM of Dasatinib (DASA) for 24 hours. Cytometry analysis after Annexin V/DAPI labelling (Left panel). Histograms for Annexin V+ DAPI+ cells (Top right panel) and Annexin V+ DAPI- cells (Bottom right panel). \*\*\*\* p < 0.0001, 2-way ANOVA analysis. D) K562 cells were stimulated or not with 0.5 $\mu$ M of BJE6-106 (BJE6), 1 $\mu$ M of Imatinib (IMA), 2nM of Dasatinib (DASA) or combinations for 24 hours. Cell lysates were analyzed by immunoblotting for indicated proteins.

### 266 2.5. Combination of BCR-ABL and PKC $\delta$ inhibitors targets stem/progenitor CML cells.

267 Before addressing the role of PKC $\delta$  on primary CML cells, we evaluated the toxicity range of 268 BJE6 on the differentiation of healthy CD34<sup>+</sup> cells. The sensitivity of normal CD34<sup>+</sup> to BJE6 appeared 269 to be greater compared to CML cell lines with about 50% of differentiation inhibition with 1µM BJE6 270 (Figure S11). That is why we chose to use  $0.1\mu$ M of the PKC $\delta$  inhibitor on CML primary cells. 271 Healthy cord blood CD34<sup>+</sup> cells transduced with BCR-ABL produced slightly more CFC colonies 272 than normal counterparts (Figure 5A). Treatment with 0.1µM BJE6 clearly decreased CFC colonies 273 numbers by 50% while it had no effect on normal CD34<sup>+</sup> cells (Figure 5A). We then observed that 274 inhibition of PKC $\delta$  was sufficient to decrease clonogenicity of CML CD34<sup>+</sup> cells by 75% with a very 275 homogeneous response between different patients compared to IMA that reduced their 276 clonogenicity by only 60% with more heterogeneous responses among patients (Figure 5B). The 277 dual inhibition of BCR-ABL and PKCδ decreased by 90% the clonogenic capacity of CML CD34<sup>+</sup> 278 cells by using IMA (Figure 5B) or DASA, NILO, BOSU and PONA (Figure S12).

Very importantly, the frequency of untreated CML CD34<sup>+</sup>cells (1/185) in long term culture-initiating
cells (LTC-IC) with limiting dilution assay (LDA) was very slightly reduced when IMA was added
(1/240) while BJE6 alone was very effective to significantly reduce this frequency by 3.1-fold (1/565)
(Figure 5C and 5D). Furthermore, we also observed that combination of the two drugs gave an

- improved effect by 3.56-Fold (1/660) (Figure 5C and 5D) arguing that PKCδ targeting resensitized
- 284 TKI-resistant CML-LSCs.









hours with DMSO (CT), 0.5  $\mu$ M of BJE6-106 alone (BJE6), 1  $\mu$ M of imatinib (IMA), 2nM of dasatinib (DASA), combinations of BJE6 and IMA (Combo 1) or BJE6 and DASA (Combo 2). The clonogenic capacity of cells was examined after 14 days. Error bars represent SD for 3 biological replicates. \*\*\* p < 0.001, 2-way ANOVA analysis. B) Clonogenic capacity of primary CD34<sup>+</sup> cells from 9 diagnosed CML patients, treated 48 hours with DMSO (CT), 0.1  $\mu$ M of BJE6-106 alone (BJE6), 1 $\mu$ M of imatinib (IMA) or combination of BJE6 and IMA (Combo). \*\*\*\* p < 0.0001, 2-way ANOVA analysis. C) Limited dilution analysis (LDA) of CML LSCs from indicated conditions by LTC-IC assay. D)

294 LTC-IC frequencies calculated from C results.

### 295 3. Discussion

296 PKCδ was demonstrated to be a potential target to eliminate CSC in different solid tumors [21,
297 24, 25]. Furthermore, the fact that PKCδ is not critical for the proliferation or survival of normal cells
298 is strongly in favor of the potential tumor-specificity of a PKCδ-targeted approach [21].

We showed here that PKCδ targeting in CML-CD34<sup>+</sup> cells decrease the LTCs frequency alone and even more when combined with imatinib which gives hope that it is possible to eliminate the pool of LSCs in CML patients. We also demonstrated that Inhibition of PKCδ can synergize with any TKIs of the three generations used to induce cell death of CML cells and to decrease the CML-CD34<sup>+</sup> clonogenicity potential.

304 We observed here that Rottlerin and BJE6-106, described as PKCo inhibitors, induce CML cells 305 apoptosis and decreased their clonogenic potential. Nevertheless, Rottlerin was described to also 306 inhibit PKCδ-independent pathways [26, 27] and was reported to synergize with imatinib to induce 307 CML cell death independently of PKC<sup>δ</sup> [22]. Sotrastaurin, which was previously described to 308 attenuate the stemness of gastric stem cells by targeting PKC8 [28], seemed to a good candidate to 309 address the role of PKC $\delta$  in CML but unfortunately we observed a moderate consequence on CML 310 cell line proliferation with this drug, probably because it also targets PKC isoforms, like PKC $\alpha$  and 311 PKC $\beta$  that have been described to sustain proliferation in other cancer cell lines [29]. It also targets 312 other isoforms of PKC which could explain its lack of efficiency to inhibit CML cell proliferation. 313 Thus, we selected BJE6 for its PKC $\delta$  selectivity, its harmlessness to normal cells and its very marked 314 effect at low doses on the induction of apoptosis in CML cells.

315 BJE6 was shown to decrease the self-renewal of CD34<sup>+</sup> from CML patients with a strong 316 synergism with imatinib while it did not affect the differentiation of CD34<sup>+</sup> from healthy donors. We 317 showed that PKC $\delta$  inhibition decrease BMI1 expression leading to a loss in CML cells clonogenicity. 318 BMI1 controls the self-renewal of LSCs. BMI1, a polycomb protein, component of the Polycomb 319 Repressive Complex 1 (PRC1), regulates oncogenic phenotypes and promotes CSCs and therapy 320 resistance in cancer cells [30, 31]. Pharmacological BMI1 inhibitors, like PTC-209 [32-34] and 321 PTC-296 [35], led to promising results in different types of cancers but without associated 322 treatments offered to date. Our results indicated that  $PKC\delta$  inhibition can be an alternative to 323 decrease BMI1 expression and subsequently reduce CML clonogenicity.

324 Although decreasing STAT5 expression has been shown to be implicated in the diminution of 325 LSCs pool in CML [36], we demonstrated here that PKCδ inhibition didn't affect the 326 BCR-ABL-STAT5-CRKL pathway. The more pronounced effect of PKCδ inhibition in combination 327 with TKIs, was to decrease the expression of pro-survival molecules of the Bcl2 family: Bcl-2, Bcl-xL 328 and Mcl-1. This targeting of anti-apoptotic members can explain how BJE6 can sensitize LSCs to 329 TKIs while sparing HSCs. Indeed, Bcl-2 was shown to be over-expressed in quiescent LSCs but not 330 HSCs [37]. In this context treatment with pan-Bcl-2 inhibitors was demonstrated to be efficient to 331 sensitize Bone-marrow human LSCs to TKIs [38] and it could be interesting to associate them with 332 BJE6 to increase the magnitude of the effects.

Numerous studies described the implication of Bcl-xL family members in survival of LSCs but inhibition of Bcl-2 with ABT-737 was reported to be insufficient to prevent disease progression [39]. Obviously, there is a need to also inhibit Mcl-1 that is implicated in both leukemogenesis acceleration [40] and increase resistance [41-43]. The fact that it is necessary to block the two pro-survival Bcl-2 family members to initiate apoptosis [42], renders pan-Bcl-2 inhibitors very attractive in cancer therapy and, in this context, targeting of PKCδ by BJE6, that increases inhibition
of both Bcl-2 and Mcl-1, could be a new promising approach. On another hand, it was recently
shown in AML that Bcl-2 inhibition enhances mitochondrial priming toward apoptosis induced by
the Src family kinase inhibitor RK-20449 [44]. This could explain the synergistic effect we observed
by TMRE experiments in the case of combination of PKCδ inhibition and BCR-ABL targeting on
CML apoptosis.

344 Otherwise, by testing the association of PKC $\delta$  inhibition with the different available TKIs we 345 expected to obtain a greater number of high synergy combinations with dual TKIs like DASA. 346 Surprisingly, combination of BJE6 with DASA gave a lower ranger of high synergy combinations 347 compared to BJE6 with IMA. This observation could be the consequence of both Src inhibition with 348 DASA and partial control of PKC $\delta$  by Src kinases [45]. However, this does not exclude the 349 possibility that this type of combination could be of interest in a context of resistance associated 350 with over-expression of Src kinases.

351

To date, the only way to cure CML with the possibility to stop the treatment without relapse is probably to eliminate differentiated mature leukemia cells, leukemia progenitors and LSCs. The dual approach we proposed could be very efficient on proliferative CML cells targeted by any TKI available in first line treatment and on TKI-insensitive quiescent CML cells after PKCδ inhibition. Furthermore, all these combinations could give new opportunities to propose personalized treatments with the maximum of efficacy.

### 358 4. Materials and Methods

### 359 4.1. Reagent and antibodies

RPMI 1640 media, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate and fetal calf serum were purchased from Gibco (Invitrogen Life Technologies). Sodium fluoride, sodium orthovanadate, aprotinin, leupeptin, phenyl-methylsulfonyl fluoride, Triton X-100 were from Sigma. Imatinib mesylate was purchased from Enzo Life Sciences, Nilotinib from Selleck chemicals and doxycyclin from Calbiochem. Validated small-interfering RNAs (siRNAs) were from ThermoFisher Scientific. Antibodies used in these studies are listed in the next table.

366 4.2. Cell lines

The human CML cell lines LAMA-84 and K562 (ATCC) and A1-K562 [23] were regularly tested
for mycoplasma contamination (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit-Lonza #LT07-418). A1-K562
cells expressing the Tetracycline repressor (Tet-K562) by stable transfection of the pCDNA6-TR
plasmid (Invitrogen Life Technologies) was previously described [23]. The mouse M2-10B4 cell line
derived from bone marrow stromal cells was from StemCell technologies.

- All cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 5 % fœtal calf serum,
   1mM Sodium Pyruvate, 50 U/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin.
- 374 *4.3. Proliferation Assay*

Cell proliferation was assessed with IncuCyte technology. Cells were grown and treated on
12-well plates and put on IncuCyte Zoom Imaging system (Essen Bioscience). Optical density of
cells was measured in 9 squares per pit (in triplicate) and real-time proliferation was assessed from
hour one to 48 hours. 4 × 10<sup>5</sup> cells were seeded per pit.

379 4.4. DNA synthesis assay

DNA synthesis was determined using an ELISA bromodeoxyuridine (BrdU) kit according to
 the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics). Cells (20x10<sup>3</sup> cells/100 μl) were incubated in a
 96-well plate with effectors before fixing, denaturation, addition of anti-BrdU antibody and

383 monoclonal antibody anti-BrDu conjugated with peroxidase before colorimetric detection at 450 384 nm.

### 385 4.5. WST-1 assay

Cell metabolism was determined using a WST-1 based Colorimetric assay (Roche Diagnostics).
 Cells (20x10<sup>3</sup> cells/100µl) were incubated in a 96-well plate with effectors. The WST-1 reagent added
 to each well is transformed into an orange formazan dye (490 nm) by metabolically active cells. Each
 assay was performed in quadruplicate.

### 390 4.6. Viability assay and Synergy calculation scores

Cells were stained with DAPI prior to flow cytometry analysis in 96-well plates and analyzed
 with MACSQuant or MACSQuant VYB flow cytometers (Miltenyi Biotec). DAPI negative cells were
 counted in absolute number and treated conditions were normalised to control.

The calculation of synergy scores was performed with SynergyFinder software (https://synergyfinder.fimm.fi). Briefly, the synergy score for drug combinations is averaged over all the dose combination measurments. Highest single agent (HSA) model was used to quantify the degree of synergy. Dose-response curves were fitted with a four-parameter logistic regression (LL4) and a readout viability baseline correction was applied.

### 399 4.7. Analysis of Apoptosis

400 Apoptosis was assessed by using AnnexinV-DAPI staining. Briefly, cells were washed with 401 PBS 2% FCS, then stained in buffer containing FITC-annexin V (Miltenyi, 130-097-928) and 402 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma, D9542-5MG) for 15 min at room temperature (°C) 403 according to the manufacturer protocol. Cells were washed, resuspended in PBS 2% FCS and 404 analyzed by flow cytometry (MACSQUANT 10). The FlowJo® software V10 was used to analyze 405 data.

### 406 4.8. Mitochondrial Membrane Potential measurement ( $\Delta \Psi m$ )

407 The  $\Delta \Psi m$  was measured after tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE) 408 incorporation by flow cytrometry (Sigma, T669). TMRE is a cell permeant and positively charged 409 dye that readily accumulates in active mitochondrias due to their relative negative charge. 410 Damaged and/or inactive mitochondrias have a loss of membrane potential resuling in TMRE 411 decrease. Cells were washed with PBS 2% FCS, then stained (10<sup>5</sup> cells) with 200 nM TMRE for 15 412 min at room temperature (°C). Cells were washed, resuspended in PBS 2% FCS and analyzed by 413 flow cytometry (MACSQUANT 10). The FlowJo® software V10 was used to analyze data.

### 414 *4.9. Primary cells isolation*

415 Bone marrow samples were collected from patients newly diagnosed for CML as part of an 416 institutionally approved cellular sample collection protocol (Centre Hospitalier Nice, France). 417 CD34<sup>+</sup> cell samples or cord blood were collected from healthy donors after informed consent. 418 Mononuclear cells were isolated by density centrifugation (Ficoll-Paque Plus, StemCell 419 technologies), washed with phosphate buffered saline, 5% fetal calf serum (FCS) and labeled with 420 CD34 microbeads (CD34 MicroBead Kit, Miltenvi Biotec). CD34<sup>+</sup> cells after sorting were stained 421 with anti-human CD34 (Miltenyi, 130-113-741) and checked by flow cytometry to ensure purity 422 (always above 96%).

### 423 4.10. Colony Forming Cell (CFC) Assay:

424 Cells from Human cell lines were grown on 12-well plates (3x10<sup>3</sup> cells/well) grown in semi solid 425 methyl cellulose medium (STEM MACSQ HCF-CFU Basic, Miltenyi Biotec) in the presence of 426 indicated drugs. After 7 days, colonies were labelled with MTT and quantified with ImageJ427 software.

Primary CD34<sup>+</sup> CML cells were plated in serum-free medium (HPC Expansion medium from
PromoCell) in the presence of indicated drugs. After 48 hours, cells (0.9x10<sup>3</sup>) from each condition
were transferred in 1ml of alpha-MEM based methylcellulose medium (GF H4434, Stemcell
Technologies) in 35 mm tissue culture dish. Cells were scored and collected after 14 days incubation
at 37°C and 5% CO2.

### 433 4.11. Long-Term Initiating Cell (LTC-IC) with limiting dilution assays (LDA)

LTC-IC with LDA were performed in StemSpan SFEM medium (Stemcell technologies) on irradiated stromal M2.10B4 monolayers at several dilutions of CD34<sup>+</sup> cells (300, 150, 75, or 37 cells per well for CML CD34<sup>+</sup> cells in 96-well plates with 16 replicate wells per concentration. Cells were kept for a minimum of 5 weeks with half-media change once per week. Remaining cells after this period were assessed by CFC and frequencies were calculated with L-Calc software.

439 4.12. Plasmids, transfection and luciferase reporter assays.

All PKC constructs were in pcDNA4 vector (Invitrogen Life Technologies). Tet-K562 cells were
transfected with 1µg of each PKC-containing vector using the Nucleofactor Amaxa protocol T16
and kit V (LonzaAG) to create corresponding tet-on inducible PKC.

443 BCR-ABL lentiviral vector: amplification product was subcloned into a pCR(R)-XL TOPOR 444 plasmid (Invitrogen Life Technologies) before being inserted into the SIV-GAE-SSFV lentiviral 445 transfer vector, followed by DNA sequencing. An SIV GAE-SSFV eGFP vector was used as a 446 control. The SIV vectors were produced as previously described [46].

447 Lentiviral transduction of CD34<sup>+</sup> cells: cells were suspended (5x10<sup>4</sup>/ml) in StemSpan medium 448 (StemCell Technologies) supplemented with protamine sulfate (4µg/ml), SCF (100 ng/ml), Flt-3-L 449 (100 ng/ml), IL-3 (20 ng/ml), and IL-6 (20 ng/ml), in a 96-well plate coated with RetroNectinR 450 (Takara Shuzo Co.). Cell Suspensions were incubated for 16 hours. Lentiviral vectors were then 451 added on cell Suspensions for a 12 hours incubation period. Cells were washed twice before 452 seeding. Transduction efficiency was evaluated at day 3 by GFP detection using flow cytometry. For 453 luciferase assays, 10<sup>6</sup> cells were plated in 24-well plates and cells were electroporated with the 454 Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V with 1µg of respective reporter plasmid and other plasmids. 16 455 hours after transfection cells were lysed with 80µl of lysis buffer (Promega, France) for 20 min. 456 Luciferase activity of 20µl of cell lysate was measured via the dual luciferase reporter assay system.

457 4.13. Western blot

458 Cell extracts were made in lysis buffer (50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 20mM EDTA,
459 100μM NaF, 10mM Na3VO4, 1% Nonidet P-40 and protease inhibitors). Proteins (40μg) were
460 separated on 10% SDS-PAGE gels. Western blotting was performed using standard methods and
461 ECL detection (Amersham Pharmacia) and Light signals were recorded as previously described
462 [23].

463

464	Table 3. Antibodies used in	n Western Blot experiments.
-----	-----------------------------	-----------------------------

465

Targets	Antibodies	Ref	Supplier
Actin	Actin (I-19)	sc-1616	SCB
Bcl-2	Bcl-2 (C 21)	sc-783	SCB
Bcl-xL	Bcl-xL	2762	CST
Bmi1	Bmi1 (F6)	05-637	Merck Millipore (Upstate)
BCR	BCR	3902 S	CST
Caspase 3	Caspase 3	9662 S	CST
Caspase 9	Caspase 9	9502 T	CST

CRKL	CRKL (32H4)	3182	CST
HSP60	HSP60 (K-19)	sc-1722	SCB
HSP90	HSP 90 $\alpha/\beta$ Antibody (F-8)	sc-13119	SCB
Mcl-1	Mcl-1 (D35A5)	5453 S	CST
Myc-tag	Myc-tag clone 4A6	05-724	Merck Millipore (Upstate)
PARP	PARP	9542 S	CST
P-c Abl	P-c Abl (Y245) (73E5)	2868 S	CST
P-CRKL	P-CRKL (Tyr207)	3181 S	CST
P-STAT5	P-STAT5 (Tyr694) (C11C5)	9359 S	CST
РКСб	РКСб	2058 S	CST
STAT5	STAT5 (D2O6Y)	94205	CST

### 466 4.14. Stastitical analysis:

467 All statistical analyses were performed using Prism 6 (GraphPad Software, Version 6.0, San 468 Diego, CA, USA). For studies involving 2 independent groups, t-tests were performed. For 3 or 469 more independent groups, two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test was performed. All tests 470 were two tailed. Throughout, asterisks designated significance (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; 471 \*\*\*\* p < 0.0001).

### 472 5. Conclusions

473 Up to date, to the best of our knowledge, the present study is the first to determine the 474 biological role of *PRKCD* in both proliferation of differentiated CML cells and self-renewal activity 475 of CD34<sup>+</sup> Leukemic Stem Cells. Targeting of PKC $\delta$  in combination with any of the first, second and 476 third generation of TKI could give new options to fully cure CML patients.

477 Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1. Synergy of 478 PKCo and BCR-ABL inhibitions on K562 proliferation, Figure S2. Synergy of PKCo and BCR-ABL inhibitions 479 on K562 cell death, Figure S3. PKC8 control BMI1 transcription, blockade, Figure S4. Inhibition of PKC8 does 480 not affect the BCR-ABL-STAT5-CRKL pathway, Figure S5. Inhibition of PKC8 enhances the mitochondrial 481 depolarization induced by TKIs in LAMA-84 cells, Figure S6. Inhibition of PKCô enhances the mitochondrial 482 depolarization induced by TKIs in K562 cells, Figure S7. Inhibition of PKC8 enhances the late apoptosis 483 induced by TKIs in K562 cells, Figure S8. Inhibition of PKC8 enhances the biochemical apoptosis events 484 induced by TKIs in CML cells, Figure S9. Inhibition of PKC8 enhances the early apoptosis induced by TKIs in 485 CML cells, Figure S10. Inhibition of PKCδ enhances apoptosis induced by any TKIs in CML cells, Figure S11. 486 Evaluation of BJE6 toxicity on healthy CD34<sup>+</sup> cells, Figure S12. Dual inhibition of PKC8 and BCR-ABL inhibits 487 CML CD34<sup>+</sup> clonogenicity.

Author Contributions: Conceptualization D.M.; Investigation, F.M., L.M., R.M., D.F., R.W., M.R., E.V., and
D.M.; Data curation, F.M., and D.M.; Formal analysis, F.M., and D.M.; Funding acquisition, DM; Methodology,
F.M., and D.M.; Project administration, D.M.; Supervision, D.M.; Technical assistance, M.N.; Collecting clinical
samples, L.L., A.G., and N.R.; Writing—Original draft, F.M., and D.M.; Writing—Review & editing, F.M., E.V.,
J-F.P. and D.M.

**Funding:** This work was supported in part by FiLMC-Pfizer grant and by INSERM. Fabien Muselli has been supported by a grant from the French Ministry of Research through Université Côte d'Azur and a 4<sup>th</sup> year PhD

495 grant from the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC).

496 Acknowledgments: We thank Drs Bernard Mari and Patrick Martin for the gift of the PKC construct plasmids
497 and Dr Goberdhan Dimri for the gift of the BMI1 promoter plasmid. We also thank Arnaud Jacquel and
498 Nathan Furtoss for the gift of CML cell lines. We are grateful to Stéphane Prost for the gift of the BCR-ABL
499 lentiviral vector. This work has benefited from the facilities of the microscopy platform of Centre
500 Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) through the expertise of Maeva Gesson and Marie Hirondelle.

501 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.
#### 19 of 22

#### 502 References

- Dan, S.; Naito, M.; Tsuruo, T., Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive
   chronic myelogenous leukemia cells by an inhibitor of BCR ABL tyrosine kinase, CGP 57148. *Cell Death Differ* 1998, 5, (8), 710-5.
- Fang, G.; Kim, C. N.; Perkins, C. L.; Ramadevi, N.; Winton, E.; Wittmann, S.; Bhalla, K. N., CGP57148B
   (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells
   to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood* 2000, 96, (6), 2246-53.
- An, X.; Tiwari, A. K.; Sun, Y.; Ding, P. R.; Ashby, C. R., Jr.; Chen, Z. S., BCR-ABL tyrosine kinase
  inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res* 2010, 34, (10), 1255-68.
- Tipping, A. J.; Baluch, S.; Barnes, D. J.; Veach, D. R.; Clarkson, B. M.; Bornmann, W. G.; Mahon, F. X.;
   Goldman, J. M.; Melo, J. V., Efficacy of dual-specific Bcr-Abl and Src-family kinase inhibitors in cells
   sensitive and resistant to imatinib mesylate. *Leukemia* 2004, 18, (8), 1352-6.
- 515 5. Keller, G.; Schafhausen, P.; Brummendorf, T. H., Bosutinib: a dual SRC/ABL kinase inhibitor for the 516 treatment of chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol* **2009**, *2*, (5), 489-97.
- 517 6. Tan, F. H.; Putoczki, T. L.; Stylli, S. S.; Luwor, R. B., Ponatinib: a novel multi-tyrosine kinase inhibitor
  518 against human malignancies. *Onco Targets Ther* 2019, 12, 635-645.
- Mahon, F. X.; Rea, D.; Guilhot, J.; Guilhot, F.; Huguet, F.; Nicolini, F.; Legros, L.; Charbonnier, A.;
  Guerci, A.; Varet, B.; Etienne, G.; Reiffers, J.; Rousselot, P.; Intergroupe Francais des Leucemies
  Myeloides, C., Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have
  maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop
  Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 2010, 11, (11), 1029-35.
- Lapidot, T.; Sirard, C.; Vormoor, J.; Murdoch, B.; Hoang, T.; Caceres-Cortes, J.; Minden, M.; Paterson,
   B.; Caligiuri, M. A.; Dick, J. E., A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation
   into SCID mice. *Nature* 1994, 367, (6464), 645-8.
- 527 9. Bonnet, D.; Dick, J. E., Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from
  528 a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997, 3, (7), 730-7.
- Muselli, F.; Peyron, J. F.; Mary, D., Druggable Biochemical Pathways and Potential Therapeutic
  Alternatives to Target Leukemic Stem Cells and Eliminate the Residual Disease in Chronic Myeloid
  Leukemia. *Int J Mol Sci* 2019, 20, (22).
- 532 11. Corbin, A. S.; Agarwal, A.; Loriaux, M.; Cortes, J.; Deininger, M. W.; Druker, B. J., Human chronic
  533 myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin*534 *Invest* 2011, 121, (1), 396-409.
- Hamilton, A.; Helgason, G. V.; Schemionek, M.; Zhang, B.; Myssina, S.; Allan, E. K.; Nicolini, F. E.;
  Muller-Tidow, C.; Bhatia, R.; Brunton, V. G.; Koschmieder, S.; Holyoake, T. L., Chronic myeloid
  leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood* 2012, 119,
  (6), 1501-10.
- 539 13. Cooke, M.; Magimaidas, A.; Casado-Medrano, V.; Kazanietz, M. G., Protein kinase C in cancer: The
  540 top five unanswered questions. *Mol Carcinog* 2017, 56, (6), 1531-1542.
- 54114.Jackson, D. N.; Foster, D. A., The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell proliferation542and survival. *FASEB J* 2004, 18, (6), 627-36.

543	15.	Tam, W. L.; Lu, H.; Buikhuisen, J.; Soh, B. S.; Lim, E.; Reinhardt, F.; Wu, Z. J.; Krall, J. A.; Bierie, B.;
544		Guo, W.; Chen, X.; Liu, X. S.; Brown, M.; Lim, B.; Weinberg, R. A., Protein kinase C alpha is a central
545		signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells. Cancer Cell 2013, 24, (3), 347-64.
546	16.	Kahana, S.; Finniss, S.; Cazacu, S.; Xiang, C.; Lee, H. K.; Brodie, S.; Goldstein, R. S.; Roitman, V.; Slavin,
547		S.; Mikkelsen, T.; Brodie, C., Proteasome inhibitors sensitize glioma cells and glioma stem cells to
548		TRAIL-induced apoptosis by PKCepsilon-dependent downregulation of AKT and XIAP expressions.
549		<i>Cell Signal</i> <b>2011,</b> 23, (8), 1348-57.
550	17.	Basu, A.; Pal, D., Two faces of protein kinase Cdelta: the contrasting roles of PKCdelta in cell survival
551		and cell death. <i>ScientificWorldJournal</i> <b>2010</b> , 10, 2272-84.
552	18.	Bessa, C.; Soares, J.; Raimundo, L.; Loureiro, J. B.; Gomes, C.; Reis, F.; Soares, M. L.; Santos, D.; Dureja,
553		C.; Chaudhuri, S. R.; Lopez-Haber, C.; Kazanietz, M. G.; Goncalves, J.; Simoes, M. F.; Rijo, P.; Saraiva,
554		L., Discovery of a small-molecule protein kinase Cdelta-selective activator with promising application
555		in colon cancer therapy. <i>Cell Death Dis</i> <b>2018</b> , 9, (2), 23.
556	19.	Takashima, A.; English, B.; Chen, Z.; Cao, J.; Cui, R.; Williams, R. M.; Faller, D. V., Protein kinase
557		Cdelta is a therapeutic target in malignant melanoma with NRAS mutation. ACS Chem Biol <b>2014</b> , 9, (4),
558		1003-14.
559	20.	Lee, P. C.; Fang, Y. F.; Yamaguchi, H.; Wang, W. J.; Chen, T. C.; Hong, X.; Ke, B.; Xia, W.; Wei, Y.; Zha,
560		Z.; Wang, Y.; Kuo, H. P.; Wang, C. W.; Tu, C. Y.; Chen, C. H.; Huang, W. C.; Chiang, S. F.; Nie, L.; Hou,
561		J.; Chen, C. T.; Huo, L.; Yang, W. H.; Deng, R.; Nakai, K.; Hsu, Y. H.; Chang, S. S.; Chiu, T. J.; Tang, J.;
562		Zhang, R.; Wang, L.; Fang, B.; Chen, T.; Wong, K. K.; Hsu, J. L.; Hung, M. C., Targeting PKCdelta as a
563		Therapeutic Strategy against Heterogeneous Mechanisms of EGFR Inhibitor Resistance in
564		EGFR-Mutant Lung Cancer. <i>Cancer Cell</i> <b>2018</b> , 34, (6), 954-969 e4.
565	21.	Chen, Z.; Forman, L. W.; Williams, R. M.; Faller, D. V., Protein kinase C-delta inactivation inhibits the
566		proliferation and survival of cancer stem cells in culture and in vivo. BMC Cancer 2014, 14, 90.
567	22.	Kurosu, T.; Tsuji, K.; Kida, A.; Koyama, T.; Yamamoto, M.; Miura, O., Rottlerin synergistically
568		enhances imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells through its mitochondrial
569		uncoupling effect independent of protein kinase C-delta. Oncogene 2007, 26, (21), 2975-87.
570	23.	Mourgues, L.; Imbert, V.; Nebout, M.; Colosetti, P.; Neffati, Z.; Lagadec, P.; Verhoeyen, E.; Peng, C.;
571		Duprez, E.; Legros, L.; Rochet, N.; Maguer-Satta, V.; Nicolini, F. E.; Mary, D.; Peyron, J. F., The BMI1
572		polycomb protein represses cyclin G2-induced autophagy to support proliferation in chronic myeloid
573		leukemia cells. <i>Leukemia</i> <b>2015</b> , 29, (10), 1993-2002.
574	24.	Mauro, L. V.; Grossoni, V. C.; Urtreger, A. J.; Yang, C.; Colombo, L. L.; Morandi, A.; Pallotta, M. G.;
575		Kazanietz, M. G.; Bal de Kier Joffe, E. D.; Puricelli, L. L., PKC Delta (PKCdelta) promotes tumoral
576		progression of human ductal pancreatic cancer. <i>Pancreas</i> <b>2010</b> , 39, (1), e31-41.
577	25.	Yoon, C. H.; Kim, M. J.; Park, M. J.; Park, I. C.; Hwang, S. G.; An, S.; Choi, Y. H.; Yoon, G.; Lee, S. J.,
578		Claudin-1 acts through c-Abl-protein kinase Cdelta (PKCdelta) signaling and has a causal role in the
579		acquisition of invasive capacity in human liver cells. J Biol Chem <b>2010</b> , 285, (1), 226-33.
580	26.	Bazuine, M.; van der Zon, G. C.; van de Ven, R.; van den Broek, P. J.; Antonie Maassen, J., Rottlerin
581		inhibits multiple steps involved in insulin-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Biochem
582		<i>Pharmacol</i> <b>2004</b> , 68, (1), 105-12.
583	27.	Soltoff, S. P., Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta. Trends Pharmacol Sci
584		2007, 28, (9), 453-8.

585	28.	Yuan, Y.; Yangmei, Z.; Rongrong, S.; Xiaowu, L.; Youwei, Z.; Sun, S., Sotrastaurin attenuates the
586		stemness of gastric cancer cells by targeting PKCdelta. Biomed Pharmacother 2019, 117, 109165.
587	29.	Chu, W. K.; Dai, P. M.; Li, H. L.; Pao, C. C.; Chen, J. K., Nanog expression is negatively regulated by
588		protein kinase C activities in human cancer cell lines. Carcinogenesis 2013, 34, (7), 1497-509.
589	30.	Glinsky, G. V.; Berezovska, O.; Glinskii, A. B., Microarray analysis identifies a death-from-cancer
590		signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. J Clin Invest 2005, 115,
591		(6), 1503-21.
592	31.	Siddique, H. R.; Parray, A.; Tarapore, R. S.; Wang, L.; Mukhtar, H.; Karnes, R. J.; Deng, Y.; Konety, B.
593		R.; Saleem, M., BMI1 polycomb group protein acts as a master switch for growth and death of tumor
594		cells: regulates TCF4-transcriptional factor-induced BCL2 signaling. PLoS One 2013, 8, (5), e60664.
595	32.	Kreso, A.; van Galen, P.; Pedley, N. M.; Lima-Fernandes, E.; Frelin, C.; Davis, T.; Cao, L.; Baiazitov, R.;
596		Du, W.; Sydorenko, N.; Moon, Y. C.; Gibson, L.; Wang, Y.; Leung, C.; Iscove, N. N.; Arrowsmith, C. H.;
597		Szentgyorgyi, E.; Gallinger, S.; Dick, J. E.; O'Brien, C. A., Self-renewal as a therapeutic target in human
598		colorectal cancer. <i>Nat Med</i> <b>2014</b> , 20, (1), 29-36.
599	33.	Kong, Y.; Ai, C.; Dong, F.; Xia, X.; Zhao, X.; Yang, C.; Kang, C.; Zhou, Y.; Zhao, Q.; Sun, X.; Wu, X.,
600		Targeting of BMI-1 with PTC-209 inhibits glioblastoma development. Cell Cycle 2018, 17, (10),
601		1199-1211.
602	34.	Shen, H. T.; Chien, P. J.; Chen, S. H.; Sheu, G. T.; Jan, M. S.; Wang, B. Y.; Chang, W. W.,
603		BMI1-Mediated Pemetrexed Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Is Associated with
604		Increased SP1 Activation and Cancer Stemness. <i>Cancers (Basel)</i> <b>2020</b> , 12, (8).
605	35.	Balakrishnan, I.; Danis, E.; Pierce, A.; Madhavan, K.; Wang, D.; Dahl, N.; Sanford, B.; Birks, D. K.;
606		Davidson, N.; Metselaar, D. S.; Meel, M. H.; Lemma, R.; Donson, A.; Vijmasi, T.; Katagi, H.; Sola, I.;
607		Fosmire, S.; Alimova, I.; Steiner, J.; Gilani, A.; Hulleman, E.; Serkova, N. J.; Hashizume, R.; Hawkins,
608		C.; Carcaboso, A. M.; Gupta, N.; Monje, M.; Jabado, N.; Jones, K.; Foreman, N.; Green, A.; Vibhakar,
609		R.; Venkataraman, S., Senescence Induced by BMI1 Inhibition Is a Therapeutic Vulnerability in
610		H3K27M-Mutant DIPG. Cell Rep 2020, 33, (3), 108286.
611	36.	Prost, S.; Relouzat, F.; Spentchian, M.; Ouzegdouh, Y.; Saliba, J.; Massonnet, G.; Beressi, J. P.;
612		Verhoeven, E.; Raggueneau, V.; Maneglier, B.; Castaigne, S.; Chomienne, C.; Chretien, S.; Rousselot,
613		P.; Leboulch, P., Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPARgamma agonists.
614		<i>Nature</i> <b>2015</b> , 525, (7569), 380-3.
615	37.	Lagadinou, E. D.; Sach, A.; Callahan, K.; Rossi, R. M.; Neering, S. J.; Minhajuddin, M.; Ashton, J. M.;
616		Pei, S.; Grose, V.; O'Dwyer, K. M.; Liesveld, J. L.; Brookes, P. S.; Becker, M. W.; Jordan, C. T., BCL-2
617		inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia
618		stem cells. Cell Stem Cell <b>2013</b> , 12, (3), 329-41.
619	38.	Goff, D. J.; Court Recart, A.; Sadarangani, A.; Chun, H. J.; Barrett, C. L.; Krajewska, M.; Leu, H.;
620		Low-Marchelli, J.; Ma, W.; Shih, A. Y.; Wei, J.; Zhai, D.; Geron, I.; Pu, M.; Bao, L.; Chuang, R.; Balaian,
621		L.; Gotlib, J.; Minden, M.; Martinelli, G.; Rusert, J.; Dao, K. H.; Shazand, K.; Wentworth, P.; Smith, K.
622		M.: Jamieson, C. A.: Morris, S. R.: Messer, K.: Goldstein, L. S.: Hudson, T. J.: Marra, M.: Frazer, K. A.:
623		Pellecchia, M.; Reed, J. C.; Jamieson, C. H., A Pan-BCL2 inhibitor renders bone-marrow-resident
624		human leukemia stem cells sensitive to tyrosine kinase inhibition. <i>Cell Stem Cell</i> <b>2013</b> . 12. (3), 316-28.
625	39.	van Delft, M. F.; Wei, A. H.; Mason, K. D.; Vandenberg, C. I.; Chen, L.; Czabotar, P. F.; Willis, S. N.
626		Scott, C. L.; Day, C. L.; Corv, S.; Adams, J. M.; Roberts, A. W.; Huang, D. C., The BH3 mimetic ABT-737

627		targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized.
628		<i>Cancer Cell</i> <b>2006,</b> 10, (5), 389-99.
629	40.	Beverly, L. J.; Varmus, H. E., MYC-induced myeloid leukemogenesis is accelerated by all six members
630		of the antiapoptotic BCL family. Oncogene 2009, 28, (9), 1274-9.
631	41.	Chen, S.; Dai, Y.; Harada, H.; Dent, P.; Grant, S., Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality
632		by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. Cancer Res 2007, 67, (2), 782-91.
633	42.	Vogler, M.; Butterworth, M.; Majid, A.; Walewska, R. J.; Sun, X. M.; Dyer, M. J.; Cohen, G. M.,
634		Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to
635		ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. <i>Blood</i> 2009, 113, (18), 4403-13.
636	43.	Yecies, D.; Carlson, N. E.; Deng, J.; Letai, A., Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that
637		up-regulate MCL-1 and BFL-1. <i>Blood</i> <b>2010</b> , 115, (16), 3304-13.
638	44.	Saito, Y.; Mochizuki, Y.; Ogahara, I.; Watanabe, T.; Hogdal, L.; Takagi, S.; Sato, K.; Kaneko, A.; Kajita,
639		H.; Uchida, N.; Fukami, T.; Shultz, L. D.; Taniguchi, S.; Ohara, O.; Letai, A. G.; Ishikawa, F.,
640		Overcoming mutational complexity in acute myeloid leukemia by inhibition of critical pathways. Sci
641		<i>Transl Med</i> <b>2017,</b> 9, (413).
642	45.	Joseloff, E.; Cataisson, C.; Aamodt, H.; Ocheni, H.; Blumberg, P.; Kraker, A. J.; Yuspa, S. H., Src family
643		kinases phosphorylate protein kinase C delta on tyrosine residues and modify the neoplastic
644		phenotype of skin keratinocytes. J Biol Chem 2002, 277, (14), 12318-23.
645	46.	Verhoeyen, E.; Relouzat, F.; Cambot, M.; Costa, C.; Negre, D.; Legrand, F.; Joubert, C.; Le Grand, R.;
646		Cosset, F. L.; Leboulch, P.; Dubart-Kupperschmitt, A.; Prost, S., Stem cell factor-displaying simian
647		immunodeficiency viral vectors together with a low conditioning regimen allow for long-term
648		engraftment of gene-marked autologous hematopoietic stem cells in macaques. Hum Gene Ther 2012,
649		23, (7), 754-68.

650



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

651



**Figure S1.** Synergy of PKC $\delta$  and BCR-ABL inhibitions on K562 proliferation. K562 cells treated for 48h with vehicle (CT), 0.3µM BJE6-106 (BJE6) 1µM Imatinib (IMA) (top panel), 2nM Dasatinib (DASA) (bottom panel) or indicated combinations. Time-lapse analysis of cells using the IncuCyte system. Graphs show quantification of cell number from phase contrast confluence counting. Data are the mean ± SD (n = 3). \*\*\*\*, P < 0.0001, two-way ANOVA analysis. A.U., arbitrary unit.



**Figure S2.** Synergy of PKC $\delta$  and BCR-ABL inhibitions on K562 cell death. K562 cells stimulated for 24 hours with the indicated conditions : with vehicle (CT), 0.5 $\mu$ M BJE6-106 (BJE6) 1 $\mu$ M Imatinib (IMA) , 2nM Dasatinib (DASA) or combinations observed by phase-contrast microscopy (Zeiss Axiocam 305 color) 20X. Scale bar is 200  $\mu$ m.



**Figure S3.** PKCð control BMI1 transcription. K562 cells transfected with PKCð siRNA. BMI1 and PKCð immunoblotting 24h after transfection (left panel). Clonogenicity potential 7 days after transfection (right panel).



**Figure S4.** Inhibition of PKC $\delta$  does not affect the BCR-ABL-STAT5-CRKL pathway. LAMA-84 cells were stimulated or not with 0.5 $\mu$ M of BJE6-106 (BJE6), 1 $\mu$ M of Imatinib (IMA), 2nM of Dasatinib (DASA) or combinations for 15 minutes. Cell lysates were analyzed by immunoblotting for indicated proteins.



**Figure S5.** Inhibition of PKC& enhances the mitochondrial depolarization induced by TKIs in LAMA-84 cells. LAMA-84 cells mitochondrial depolarization upon indicated treatments for 24 hours (A) and 48 hours (B). Cytometry analysis after TMRE staining (left panels) and Quantification of mitochondrial depolarization (Right panels).



**Figure S6.** Inhibition of PKCð enhances the mitochondrial depolarization induced by TKIs in K562 cells. K562 cells stimulated or not with indicated conditions for 48 hours. Cytometry analysis after TMRE staining (Top panels) and Quantification of mitochondrial depolarization (Bottom panels).



**Figure S7.** Inhibition of PKC $\delta$  enhances the late apoptosis induced by TKIs in K562 cells. K562 cells were stimulated or not with 0.5 $\mu$ M of BJE6-106 (BJE6) in combination or not with 1 $\mu$ M of Imatinib (IMA) or 2nM of Dasatinib (DASA) for 48 hours. Cytometry analysis after AnnexinV/DAPI labelling (Top). Histograms for AnnexinV+ DAPI- cells (Bottom left panel) and AnnexinV+ DAPI+ cells (Bottom right panel).



**Figure S8.** Inhibition of PKC $\delta$  enhances the biochemical apoptosis events induced by TKIs in CML cells. K562 cells (Left) or LAMA-84 cells (Right) stimulated or not with 0.5 $\mu$ M of BJE6-106 (BJE6), 1 $\mu$ M of imatinib (IMA), 2nM of Dasatinib (DASA) or combinations for 48 hours and 24 hours respectively. Cell lysates were analyzed by immunoblotting.





**Figure S9.** Inhibition of PKC $\delta$  enhances the early apoptosis induced by TKIs in CML cells. K562 cells (A) or LAMA-84 cells (B) were stimulated or not for 24 hours with 0.5 $\mu$ M of BJE6-106 (BJE6) in combination or not with indicated TKIs. Cytometry analysis after AnnexinV/DAPI labelling. Histograms represent early apoptosis.



**Figure S10.** K562 cells (Left) or LAMA-84 cells (Right) were stimulated or not with 0.5µM of BJE6-106 (BJE6) in combination or not with 1µM of Imatinib (IMA) or 2nM of Dasatinib (DASA), 10nM of Bosutinib (BOSU), 2nM of Nilotinib (NILO) or 2nM of Ponatinib (PONA) for 48 hours. Cytometry analysis after AnnexinV/DAPI labelling (Top panel). Histogram for AnnexinV+ DAPI+ cells (Bottom panel).



**Figure S11.** Evaluation of BJE6 toxicity on healthy CD34<sup>+</sup> cells. Clonogenic capacity of Cord blood CD34<sup>+</sup> cells examined after 14 days with indicated concentration of BJE6-106 alone (BJE6). Error bars represent SD for 3 biological replicates. CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage), BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid), CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Monocyte Megakaryocyte).



**Figure S12.** Dual inhibition of PKC $\delta$  and BCR-ABL inhibits CML CD34<sup>+</sup> clonogenicity. Clonogenic capacity of primary CD34<sup>+</sup> cells from diagnosed CML patient, treated with DMSO (CT), 2nM of Dasatinib (DASA), 2nM of Nilotinib (NILO), 10nM of bosutinib (BOSU), 2nM of Ponatinib (PONA) combined or not with 0.1  $\mu$ M of BJE6-106 alone (BJE6) was examined after 14 days.

#### **C-Conclusion**

Nous avons pu démontrer pour la première fois dans la LMC l'efficacité d'inhiber simultanément et spécifiquement la PKCδ et BCR-ABL pour éliminer les CSLs provenant de prélèvements médullaires de patients au diagnostic. En effet, le ciblage conjoint de ces deux protéines à différentes doses de leurs inhibiteurs spécifiques nous a tout d'abord permis d'apprécier un éventail de combinaisons synergiques en mort cellulaire. Nous avons pu démontrer que ces combinaisons agissaient au niveau apoptotique et plus précisément avec un renforcement de la réponse apoptotique intrinsèque induite par les ITKs avec une dépolarisation de la membrane mitochondriale, un clivage des Caspase 9 puis 3, aboutissant au clivage final de PARP. Nous avons également observé une sensibilisation des CSLs aux ITKs après inhibition de la PKCδ qui pourrait s'expliquer par la perte d'expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans ce contexte.

# Objectif 2 : Agir sur la leucémogenèse en utilisant une molécule identifiée par une approche bio-informatique.

#### A-Présentation de l'étude et résumé.

Dans une précédente étude portant sur le rôle de BMI1 dans les cellules de LMC notre équipe avait mis en évidence l'intérêt thérapeutique que peut avoir son extinction dans cette maladie. Cette étude avait notamment démontré que l'action de répresseur transcriptionnel de BMI1 pouvait s'exercer au niveau du gène suppresseur de tumeur *CCNG2* codant pour la cycline G2.

Dans cette seconde étude nous avons cherché à agir « en aval » de BMI1 en identifiant une molécule capable d'induire la réexpression de gènes réprimés par le répresseur transcriptionnel BMI1 dans les cellules leucémiques. Nous avons pour cela utilisé une analyse transcriptomique comparant des cellules leucémiques K562 avant (BMI1<sup>high</sup>) et après extinction de BMI1 par shRNA (BMI1<sup>low</sup>). Par soustraction nous avons pu générer un profil transcriptomique listant les gènes différemment exprimés entre ces deux conditions. Nous avons comparé ce profil obtenu à la base de données du Connectivity Map (Cmap), développée par le Broad Institute en 2006, obtenue sur la lignée HL-60, correspondant au modèle cancéreux de cette base le plus proche de la LMC.

La comparaison de notre profil transcriptomique (BMI1<sup>high</sup> vs BMI1<sup>low</sup>) avec cette base de données Cmap nous a fourni une liste de molécules potentiellement capable d'induire le même type de profil dans la lignée leucémique HL-60. (Table 3). Parmi ces molécules nous avons pu observer que seule l'Alexidine dihydrochloride (ALX) était capable d'induire l'expression d'un gène réprimé par BMI1, la cycline G2. C'est dans ce cadre que nous avons testé le potentiel anti-leucémique de l'ALX sur des lignées de LMC ainsi que sur des cellules provenant de prélèvements de moelle osseuses de patients diagnostiqués pour la LMC. Cette molécule appartient à la famille des bis-biguanides, proche des biguanides, metformine et phenformine pour lesquelles de nombreuses études ont démontré des actions anti-tumorales. Dans le cas de l'ALX son rôle comme agent anti-tumoral n'a été rapporté qu'en 2006 avec l'induction de l'apoptose dans des cellules de cancer de la tête et du cou sans toutefois en préciser le mécanisme (Yip, Ito et al. 2006). Très récemment l'ALX a également été décrite comme agent induisant la mort cellulaire dans les cellules de cancer du pancréas (Kasikci, Aydemir et al. 2020) et adénocarcinome (Chen, Zou et al. 2019).

Nous avons étudié ici le potentiel thérapeutique de cette molécule dans le cas de la LMC.

Rank	Drug name	Dose (µM)	Cell line	Score	Instance_id
1	Alexidine	7	HL-60	1	2576
2	Cyclopenthiaside	11	HL-60	0,934	2905
3	Genistein	10	HL-60	0,863	1176
4	Megestrol	10	HL-60	0,855	3091
5	Tenoxicam	12	HL-60	0,854	2501
6	Nystatin	4	HL-60	0,819	2500

Table 3 : Tableau récapitulatif des molécules identifiées après crible du Connectivity Map (Cmap). La comparaison du profil transcriptomique généré par l'extinction de BMI1 dans la ligné K562 avec la base de données du Cmap dans la ligné HL-60 a permis l'identification de plusieurs composés classés en fonction de leur score, reflétant la similitude entre les deux signatures transcriptomiques. Seules les molécules présentant les 6 scores les plus élevés sont représentées ci-dessus.

#### Résumé de l'étude :

Utilisée à une dose n'affectant pas la différenciation des cellules CD34+ de donneurs sains, l'ALX réduit fortement le potentiel clonogénique des cellules CD34+ provenant de la moelle osseuse de patients LMC. Des expériences de LTC-IC et de marquages au CFSE ont permis de démontrer que l'ALX seule affectait le compartiment souche leucémique dans un ordre de grandeur similaire à celui de l'action de l'imatinib mais que la combinaison des deux molécules réduisait drastiquement la fréquence des cellules souches leucémiques. La transduction de l'oncogène BCR-ABL dans des cellules CD34+ de cordon ombilical, a permis de préciser que l'action de l'ALX était exclusivement délétère contre des cellules exprimant cet oncogène. Les premières expériences « in-vivo » ont démontré que l'ALX était capable d'atteindre les cellules leucémiques dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate en diminuant 6 fois plus leur expression à ce niveau par rapport à l'imatinib avec en plus une mortalité trois supérieure par rapport à l'ITK.

De manière plus intéressante ce bis-biguanide permet de re-sensibiliser à l'imatinib toutes les lignées de LMC rendu résistantes à cet ITK. L'opportunité de tester l'ALX sur des cellules CD34+ issues de moelle osseuse de patients n'ayant pas répondu à l'imatinib a révélé que ce bisbiguanide avait la capacité de re-sensibiliser ces cellules à l'ITK de la même manière qu'il

a été possible de lever la résistance induite par un environnement stromal dans des expériences de co-culture de lignées LMC sur des cellules stromales murines.

Si les mécanismes apoptotiques suffisent à expliquer les effets de l'ALX sur les cellules LMC proliférantes nous avons également démontré que cette molécule était capable d'inhiber presque totalement la respiration mitochondriale cette dernière représentant un mécanisme moléculaire primordial dans le maintien des cellules souches leucémiques (Lagadinou, Sach et al. 2013) et dont le ciblage a déjà été rapporté comme étant une stratégie déterminante pour éliminer les CSLs (Kuntz, Baquero et al. 2017)

#### **B-Matériels et Méthodes.**

#### Reagent and antibodies

RPMI 1640 media, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, L-glutamine and fetal calf serum were purchased from Gibco (Invitrogen Life Technologies). D-glucose was from Fluka BioChemika. Sodium fluoride, sodium orthovanadate, aprotinin, leupeptin, phenyl-methylsulfonyl fluoride, Triton X-100, oligomycin, Antimycin A and Rotenone were from Sigma. Imatinib mesylate was purchased from Enzo Life Sciences, Nilotinib from Selleck chemicals and doxycyclin from Calbiochem. Validated small-interfering RNAs (siRNAs) were from ThermoFisher Scientific. P-AMPK and AMPK antibodies were from Cell Signaling Technology.

#### Cell lines

The human CML cell lines LAMA-84 and K562 (ATCC) and their Imatinib-resistant counterparts were regularly tested for mycoplasma contamination (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit-Lonza #LT07-418). The mouse M2-10B4 cell line derived from bone marrow stromal cells was from StemCell technologies.

All cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 5 % foetal calf serum, 1mM Sodium Pyruvate, 50 U/ml penicillin and 50µg/ml streptomycin.

#### Proliferation Assay

Cell proliferation was assessed with IncuCyte technology. Cells were grown and treated on 12well plates and put on IncuCyte Zoom Imaging system (Essen Bioscience). Optical density of cells was measured in 9 squares per pit (in triplicate) and real-time proliferation was assessed from hour one to 48 hours.  $4 \times 10^5$  cells were seeded per pit.

#### Viability assay and Synergy calculation scores

Cells were stained with DAPI prior to flow cytometry analysis in 96-well plates and analyzed with MACSQuant or MACSQuant VYB flow cytometers (Miltenyi Biotec). DAPI negative cells were counted in absolute number and treated conditions were normalised to control.

The calculation of synergy scores was performed with SynergyFinder software (<u>https://synergyfinder.fimm.fi</u>). Briefly, the synergy score for drug combinations is averaged over all the dose combination measurements. Highest single agent (HSA) model was used to quantify the degree of synergy. Dose-response curves were fitted with a four-parameter logistic regression (LL4) and a readout viability baseline correction was applied. Synergy score is

considered to display antagonism from -30 to 0, additivity/slight synergy from 0 to 10, and synergy/high synergy from 10 and above.

#### Analysis of Apoptosis

Apoptosis was assessed by using AnnexinV-DAPI staining. Briefly, cells were washed with PBS 2% FCS, then stained in buffer containing FITC-annexin V (Miltenyi, 130-097-928) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma, D9542-5MG) for 15 min at room temperature according to the manufacturer protocol. Cells were washed, resuspended in PBS 2% FCS and analyzed by flow cytometry (MACSQUANT 10). The FlowJo® software V10 was used to analyze data.

#### Primary cells isolation

Bone marrow samples were collected from patients newly diagnosed for CML as part of an institutionally approved cellular sample collection protocol (Centre Hospitalier Nice, France). CD34<sup>+</sup> cell samples or cord blood were collected from healthy donors after informed consent. Mononuclear cells were isolated by density centrifugation (Ficoll-Paque Plus, StemCell technologies), washed with phosphate buffered saline, 5% fetal calf serum (FCS) and labeled with CD34 microbeads (CD34 MicroBead Kit, Miltenyi Biotec). CD34<sup>+</sup> cells after sorting were stained with anti-human CD34 (Miltenyi, 130-113-741) and checked by flow cytometry to ensure purity (always above 96%).

#### Colony Forming Cell (CFC) Assay:

Cells from Human cell lines were grown on 12-well plates (3x10<sup>3</sup> cells/well) grown in semi solid methyl cellulose medium (STEM MACSQ HCF-CFU Basic, Miltenyi Biotec) in the presence of indicated drugs. After 7 days, colonies were labelled with MTT and quantified with ImageJ software.

Primary CD34<sup>+</sup> CML cells were plated in serum-free medium (HPC Expansion medium from PromoCell) in the presence of indicated drugs. After 48 hours, cells (0.9x10<sup>3</sup>) from each condition were transferred in 1ml of alpha-MEM based methylcellulose medium (GF H4434, Stemcell Technologies) in 35 mm tissue culture dish. Cells were scored and collected after 14 days incubation at 37°C and 5% CO2.

#### Long-Term Initiating Cell (LTC-IC) with limiting dilution assays (LDA)

LTC-IC with LDA were performed in StemSpan SFEM medium (Stemcell technologies) on irradiated stromal M2.10B4 monolayers at several dilutions of CD34<sup>+</sup> cells (300, 150, 75, or 37 cells per well for CML CD34<sup>+</sup> cells in 96-well plates with 16 replicate wells per concentration. Cells were kept for a minimum of 5 weeks with half-media change once per week. Remaining cells after this period were assessed by CFC and frequencies were calculated with L-Calc software.

#### CFSE assays

Fresh CD34<sup>+</sup>-enriched cells were stained with 2mM of 5-(and 6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester (CFSE, Invitrogen) for 20 minutes at room temperature. After wash, cells were cultured (seeded 5.10/mL) in SFM StemSpan (StemCell Technologies) without cytokines and treated with or without drugs for 7 days. Cells were harvested at variable time points as indicated, collected in BD Trucount<sup>™</sup> tubes for absolute count (BD Biosciences) and labeled with anti CD45 and anti-CD34. Then, cells were diluted in 1mL of phosphate-buffered saline

(PBS, Invitrogen Life Technologies) containing 2% fetal calf serum (PAA) and stained for viability. All analyses were carried out on a Miltenyi Macsquant Flow Cytometer.

#### Plasmids and transduction

BCR-ABL lentiviral vector: amplification product was subcloned into a pCR(R)-XL TOPOR plasmid (Invitrogen Life Technologies) before being inserted into the SIV-GAE-SSFV lentiviral transfer vector, followed by DNA sequencing. An SIV GAE-SSFV eGFP vector was used as a control.

Lentiviral transduction of CD34<sup>+</sup> cells: cells were suspended (5x10<sup>4</sup>/ml) in StemSpan medium (StemCell Technologies) supplemented with protamine sulfate (4µg/ml), SCF (100 ng/ml), Flt-3-L (100 ng/ml), IL-3 (20 ng/ml), and IL-6 (20 ng/ml), in a 96-well plate coated with RetroNectinR (Takara Shuzo Co.). Cell Suspensions were incubated for 16 hours. Lentiviral vectors were then added on cell Suspensions for a 12 hours incubation period. Cells were washed twice before seeding. Transduction efficiency was evaluated at day 3 by GFP detection using flow cytometry. For luciferase assays, 10<sup>6</sup> cells were plated in 24-well plates and cells were electroporated with the Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V with 1µg of respective reporter plasmid and other plasmids. 16 hours after transfection cells were lysed with 80µl of lysis buffer (Promega, France) for 20 min. Luciferase activity of 20µl of cell lysate was measured via the dual luciferase reporter assay system.

#### Western blot

Cell extracts were made in lysis buffer (50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 20mM EDTA, 100µM NaF, 10mM Na3VO4, 1% Nonidet P-40 and protease inhibitors). Proteins (40µg) were separated on 10% SDS-PAGE gels. Western blotting was performed using standard methods and ECL detection (Amersham Pharmacia) and Light signals were recorded as previously described (Mourgues, Imbert et al. 2015).

#### Oxygen consumption measurements

Oxygen consumption rate (OCR) measurements were performed in real time with a XFe96 extracellular flux analyzer Seahorse (Agilent Technologies). K562S or K562 Imatinib-resistant cells were seeded on Cell-Tak coated 96 plates at 50 000 cells per well in 180 mL of XF base medium DMEM media (Agilent Technologies) supplemented with 20 mM D-glucose,1mM sodium pyruvate and 2mM L-glutamine from at pH 7.4. Plates were then centrifugated at 200g and incubated at 37°C for 20 to make suspension cells adhere. OCR real-time measurements were processed after serial injections of mitochondrial inhibitors respectively 1µM oligomycin, 0,5µM FCCP, 1µM of both Rotenone and Antimycin A.

#### In-vivo experiments

NSG transgenic mice were housed in our animal facility (C3M, Nice, FRANCE). K562-GFP transduced cells were injected in 6-weeks-old NSG mice by intravenous injection of 5x10<sup>5</sup> viable cells per mouse in 100µL of sterile PBS. Treatments were performed one day after cells injection. Mice were weighted every two days and injected intraperitoneally every day for 2 weeks (4 mice per group). Mice were sacrificed as soon as they exhibit serious signs of illness (hair loss, skin rash, loss of appetite...). After sacrifice, flushed bone marrow and spleen cells we collected prior to flow cytometry analysis. All experiments were performed in agreement with the Institutional Animal Care and regional ethic committee.

#### **C-Résultats.**

La combinaison de l'Alexidine (ALX) avec un Inhibiteur de Tyrosine Kinase (ITK) affecte le compartiment souche leucémique.

Afin d'évaluer les effets toxiques de l'ALX nous avons mesuré son impact sur la différentiation de cellules primaires CD34+ provenant de prélèvements de moelle osseuse de donneurs sains (Figure 1A). Une dose réponse d'ALX nous a ainsi permis d'établir l'innocuité de l'ALX à des concentrations inférieures ou égales à 3µM et de sélectionner la dose de 1µM pour les expériences ex-vivo suivantes. Nous avons ensuite utilisé des prélèvements de moelle osseuse réalisés au diagnostic de la maladie, à partir d'une cohorte de 15 patients LMC, pour évaluer l'impact de l'ALX seule ou combinée à l'imatinib (IMA) sur le potentiel clonogénique des cellules CD34+ de ces prélèvements. L'ajout de 1µM d'IMA conduit à une diminution de la clonogénicité des cellules CD34+ de patients LMC de l'ordre de 60% avec des réponses assez variables selon les patients alors que l'ALX à 1µM diminue leur potentiel clonogénique d'environ 70% et ceci de manière beaucoup plus homogène quel que soit le patient traité (Figure 1B). La combinaison des deux drogues amplifie cette diminution du potentiel clonogénique qui dans ces conditions ne représente plus que 10% de la valeur contrôle (Figure 1B). Des résultats similaires ont été obtenus en substituant un TKI de seconde (Dasatinib, Bosutinib) ou de troisième génération (Ponatinib) à l'IMA (Figure S1). Afin de comparer l'impact de l'ALX avec l'IMA sur le compartiment souche leucémique, nous avons réalisé des expériences de LTC-IC (long term culture-initiating cells) avec LDA (Limiting Dilution Assay). Nous avons pu observer que l'IMA et l'ALX seules n'induisait qu'une réduction modérée de la fréquence des cellules CD34+ de patients LMC, respectivement de 1.4 et 1.56 fois alors que la combinaison des deux molécules se révélait très efficace en réduisant cette fréquence de 3,3 fois (Figures C et D). Ces observations ont été renforcées par des expériences sur des cellules CD34+ de patients de LMC ayant été marquées au CFSE. L'ajout d'IMA sur ces cellules CD34+, en l'absence de cytokines, induit une forte baisse du nombre de cellules en division ainsi que du nombre de cellules très fortement marquées au CFSE correspondant aux cellules quiescentes et donc les plus primitives (Figure 1E). L'ajout d'ALX sur ces mêmes cellules conduit à un effet plus prononcé avec notamment une disparition totale du pool de cellules les plus quiescentes. Dans ces conditions la combinaison des deux molécules ne peut plus améliorer le résultat déjà obtenu avec l'ALX. Les deux effets différents observés avec les

techniques de LTC-IC et de marquage CFSE pourraient s'expliquer par l'effet protecteur du stroma cellulaire utiliser dans l'approche LTC-IC qui atténuerait l'effet de l'ALX. Afin d'évaluer la spécificité de l'action de l'ALX sur les cellules CD34+ exprimant l'oncogène BCR-ABL, nous avons transduit des cellules CD34+ provenant de cordon ombilical avec un vecteur lentiviral codant pour cet oncogène. Les résultats obtenus démontrent que l'ALX inhibe sélectivement la clonogénicité des cellules CD34+ exprimant l'oncogène BCR-ABL de la même manière que l'IMA que la combinaison des deux molécules accroit la baisse de clonogénicité de ces cellules BCR-ABL+ par rapport à l'effet de chacune de ces drogues utilisées seules (Figure 1F).

L'ensemble de ces résultats témoignent néanmoins que l'ALX est capable de cibler toutes les cellules leucémiques qu'elles soient proliférantes ou souches/ progénitrices.

## L'Alexidine (ALX) synergise fortement avec les Inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITKs) pour induire la mort cellulaire des cellules leucémiques

Nous avons par la suite évalué la capacité de l'ALX seule ou en combinaison avec l'IMA à inhiber la prolifération cellulaire (Fig 2A), la clonogénicité (Fig 2B) et à induire la mort cellulaire sur les lignées K562 (Fig 2C et D) et LAMA-84 (Fig S3). L'ALX inhibe la prolifération cellulaire de l'ordre de 50 % dès 13h de traitement, tout comme l'IMA et la combinaison de ces deux molécules n'est pas plus efficace à ce temps donné. Au-delà de 30 heures de traitement, et plus particulièrement à 48h, on observe un plateau d'inhibition d'environ 70 % pour l'IMA seul, de 90 % pour l'ALX et une inhibition complète de la prolifération avec la combinaison des deux molécules (Fig 2A). Nous avons ensuite comparé l'efficacité de ces molécules sur le potentiel clonogénique des cellules K562 (Fig 2B). Nous avons pu observer une efficacité similaire de l'ordre de 80 %, entre l'ALX et l'IMA pour inhiber la clonogénicité et dans ce contexte la combinaison des deux molécules induisant une diminution de la clonogénicité de plus de 90 %. Nous avons voulu confirmer par la suite la capacité de l'association ALX/IMA à induire de la mort cellulaire (Fig 2C) et son potentiel synergique (Fig 2D) sur lignée K562 ou LAMA-84 (Fig S3A et S3B). Nous avons pour cela réalisé des traitements des cellules avec des doses réponses croisées entre ces deux molécules durant 48 heures et nous avons pu observer une amplification systématique de la réponse de mort cellulaire pour les différentes combinaisons de doses que nous avons pu tester, avec des résultats similaires quel que soit l'ITK combiné à l'ALX. Par ailleurs, nous avons calculé les synergies de mort cellulaire des différentes combinaisons employées sur lignée K562 (Fig 2D et S2) et LAMA-84 (Fig 3B). Ainsi, nous avons pu démontrer que l'ALX synergise fortement avec l'Imatinib et les autres ITKs pour induire la mort cellulaire avec un score HSA de l'ordre de 20 (représentant la moyenne de l'ensemble des synergies) à l'exception de l'association avec le Dasatinib (Fig S2), avec un score de seulement 5 associé à une additivité globale plutôt qu'une synergie importante. Cette différence est toutefois à nuancer dans la mesure où on observe de fortes synergies pour des doses supérieures à 0,3µM d'ALX et de 0,3nM de DASA.

### La combinaison de l'Alexidine (ALX) avec l'Imatinib (IMA) provoque des évènements apoptotiques et amplifie ceux induits par l'ITK

Afin de mieux caractériser les voies de morts cellulaires sous-jacentes à la combinaison ALX/ITK, nous avons étudié la voie apoptotique par cytométrie en flux (Fig 3A) et par Western-Blot (Fig 3B et 3C) sur cellules K562 et LAMA-84 (Fig S3C). Nous avons ainsi pu observer, dans les cellules de la lignée K562, que la réponse apoptotique tardive induite par l'IMA (17%) (AnV+ DAPI+) était très fortement amplifiée en présence d'ALX, de l'ordre de 76% en termes au bout de 48h (Fig 3A). Une cinétique de traitement avec ALX, IMA et leur combinaison nous a permis de démontrer que l'ALX seule diminue l'expression de membres anti-apoptotiques tels que Bcl-xL à partir de 24h, augmente fortement l'expression de membres pro-apoptotiques tel que Bad à 48h et de manière très intéressante, la combinaison des deux molécules induit un début de clivage de PARP dès 6h, mais surtout induit très fortement ce clivage dès 9h et jusqu'à 24h (Fig 3B). En utilisant la lignée LAMA-84 nous avons également observé que l'ALX seule induisait un clivage important de la Caspase 3 dès 24h se poursuivant jusqu'à 48h, ainsi qu'une accélération de la fin des processus apoptotiques à 48h avec la disparition complète des formes clivées des protéines Caspase-3 et PARP en combinaison avec l'IMA (Fig S3C). Le prétraitement de cellules K562 avec du Q-VD-OPH, un inhibiteur à large spectre des Caspases, bloque totalement l'induction du clivage de PARP par l'ALX au bout de 24h, confirmant l'implication des voies apoptotiques dans les processus de morts induits par l'ALX (Fig 3C).

#### L'Alexidine permet une amélioration de la survie des souris leucémiques.

Nous avons évalué le potentiel anti-tumoral de l'ALX in vivo dans un modèle de xénogreffe dans les souris NSG en comparaison du traitement conventionnel à l'IMA. L'injection intraveineuse de cellules K562 exprimant la GFP dans ces souris a été suivie par une période de traitement de 15 jours avec du PBS, de l'ALX ou de l'IMA (Figure 4A). Cette période correspond au délai pour obtenir 100% de mortalité dans le groupe contrôle ayant reçu uniquement du PBS (Fig 4E). Les deux autres groupes de souris ont permis d'observer des courbes de survie superposables pour les deux traitements. Durant toute l'expérimentation le poids des souris n'a révélé aucune différence significative entre les groupes. De la même manière le poids des rates au décès des animaux est très proche pour les groupes ALX et IMA (Figure 4C). L'analyse du contenu cellulaire des rates et de la moelle osseuse des souris a permis de constater que le traitement à l'IMA faisait baisser le nombre de cellules GFP à environ 30% dans les deux organes dont 32% et 14% restent encore vivantes, respectivement dans la rate et dans la moelle osseuse (Figure 4D). Concernant le traitement à l'ALX, la proportion de cellules GFP est considérablement réduite par rapport au groupe contrôle, avec seulement 18% dans la rate et 5% dans la moelle osseuse et dans les deux cas seulement un tiers de ces cellules étant encore vivantes (Figure 4D).

### L'Alexidine (ALX) et la Chlorexidine (CLX) inhibent de manière hétérogène la respiration mitochondriale

Sachant que les membres de la famille des bisbiguanides dont font partie l'ALX et la CLX sont très proches des molécules de la famille des biguanides, nous avons voulu déterminer si l'ALX et la CLX étaient capable d'affecter également la respiration mitochondriale et à quel moment précis. Pour cela nous avons mesuré la respiration mitochondriale par la technologie Seahorse après respectivement 2h (Fig 5A), 4h (Fig 5B), 6h (Fig 5C) et 18 h (Fig 5D) d'ALX et de CLX sur cellules K562. Nous avons pu ainsi observer qu'avant 4h de traitement, ni l'ALX ni la CLX n'inhibent la chaîne respiratoire mitochondriale. Toutefois, dès 6h et au-delà c'est-à-dire à 18h, nous observons une forte diminution de la respiration mitochondriale basale des cellules K562 en présence de chacun des deux bisbiguanides, de l'ordre de 50 %, associée à une inhibition du même ordre de la production d'ATP liée à cette respiration mitochondriale (Fig 5C). A partir de 18h, on observe de manière intéressante un maintien de l'inhibition de la respiration mitochondriale basale de l'ordre de 50 % avec l'ALX, une forte diminution de la respiration mitochondriale maximale d'environ 30 % mais pas avec la CLX, ce qui pourrait s'expliquer par une inhibition réversible de la chaîne respiratoire en présence de CLX à des temps tardifs (Fig 5D). De plus, la respiration mitochondriale maximale n'est affectée qu'au bout de 18h et seulement avec l'ALX, suggérant ainsi une meilleure efficacité de l'ALX sur l'inhibition de la chaîne respiratoire à des temps plus tardifs et s'inscrivant durablement.

### L'Alexidine (ALX) induit un stress énergétique majeur dans des cellules leucémiques sensibles et résistances à l'Imatinib (IMA)

Nous avons par la suite évalué la capacité de l'ALX seule ou en combinaison avec l'IMA à inhiber la respiration mitochondriale pour vérifier si son efficacité sur ce processus était conservée en présence d'un ITK. (Fig 6). L'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale après 20h de traitement par l'ALX est maintenue et ce également en présence d'IMA, à la fois sur des cellules K562 sensibles (K562-S) mais aussi résistantes à l'Imatinib (K562-R) (Fig 6A). Cette inhibition est presque totale au niveau des respirations mitochondriales basales et maximales alors que l'IMA n'affecte en aucun cas ces processus. Pour évaluer si l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale était reliée à un stress énergétique plus marqué, nous avons réalisé des expériences de Western blot sur lignés K562-S et K562-R afin de vérifier les expressions des formes totales et phosphorylées (T172) de l'AMPK $\alpha$ , un senseur énergétique important (Fig 6B). Nous avons ainsi pu observer une forte augmentation de l'expression de la forme phosphorylée de l'AMPK $\alpha$  (T172) dès 16h et qui se poursuit au cours du temps sous traitement ALX dans ces deux lignés, suggérant que cette molécule induit un stress énergétique majeur. Cette activation de la voie AMPK coïncide avec la forte inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale observée dès 16h sous ALX (Fig 5D)

### L'Alexidine (ALX) synergise avec le 2-deoxyglucose (2-DG) pour induire la mort cellulaire des cellules leucémiques

L'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale par l'ALX nous a incité à vérifier son efficacité combinatoire avec une molécule, le 2-deoxyglucose (2-DG), capable d'inhiber un processus énergétique complémentaire à la respiration mitochondriale qui est la glycolyse. Pour cela nous avons réalisé des doses réponses croisées entre ces deux molécules durant 48 heures, nous avons quantifié la mort cellulaire par incorporation de DAPI en cytométrie en flux (Fig 7A), calculé les synergies de mort cellulaire (Fig 7B) et mesuré l'efficacité de ces molécules en clonogénicité sur des cellules K562 (Fig 7C). Nous avons pu observer que l'ALX synergise fortement avec le 2-DG, notamment avec des doses d'ALX supérieures à 0,3µM. La clonogénicité des cellules leucémiques est diminuée d'environ 40 % à 5mM de 2-DG soit 3 fois moins qu'en présence d'ALX et de manière très intéressante la combinaison des deux molécules permet de diminuer drastiquement le potentiel clonogénique de 90 % (Fig 7C).

L'Alexidine (ALX) resensibilise les cellules leucémiques résistance à l'Imatinib (IMA) dans un contexte hétérogène de résistances.

Nous avons par la suite voulu évaluer la capacité de l'ALX à cibler différents types de résistances aux ITKs, à savoir dans un contexte de lignés cellulaires rendues résistantes à l'IMA par incorporation progressives de doses croissantes (Fig 8A et 8B), de patients nonrépondeurs à l'IMA en première intention (Fig 8C) et de résistance stromale avec des cellules leucémiques en co-culture (Fig 8D). Nous avons observé dans un premier temps des synergies très fortes entre l'ALX et l'IMA dans des lignés leucémiques pourtant résistantes à cet ITK, suggérant une re-sensibilisation de ces dernières à l'ITK (Fig 8A et 8B). De plus, nous avons observé une diminution d'environ 75 % du potentiel clonogénique de cellules CD34+ de patients non-répondeurs à l'IMA avec l'ALX seule, l'IMA ne diminuant ce potentiel que de moitié et la combinaison des deux molécules affectant drastiquement ce paramètre au-delà de 90 % (Fig 8C). Enfin, dans un système de co-culture entre cellules stromales murines M2-10B4 et K562 nous avons pu constater une résistance à l'IMA des cellules leucémiques de l'ordre de 50 % par rapport à la ligné K562 sans support stromal pour 1µM d'IMA et de l'ordre de 20 % pour des doses plus élevée (3 et 10µM d'IMA) alors que l'ALX conserve la même efficacité en s'affranchissant du contexte stromal. La combinaison des deux molécules présente un effet modéré sur la mort cellulaire des cellules leucémiques cultivées avec support stromal avec toutefois des valeurs de mort cellulaires similaires par rapport à des cellules K562 cultivées sans support stromal (Fig 8D)

### D-Figures et légendes.

Α

CFU-E BFU-E CFU-GM CFU-GEMM





В



D

	Frequencies	Confidence Interval 95%
СТ	1/155	[1/107 – 1/224]
IMA	1/220	[1/150 – 1/330]
ALX	1/242	[1/161 – 1/362]
Combo	1/520	[1/308 – 1/880]





#### Figure 1. Combination of ALX and Imatinib eliminates CML stem cells.

**A-** Evaluation of ALX toxicity on healthy CD34+ cells. Clonogenic capacity of Cord blood CD34+ cells examined after 14 days with indicated concentration of Alexidine alone (ALX). CFU-E (Colony Forming Unit- Erythroid), CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage), BFU-E (Burst Forming Unit – Erythroid), CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Monocyte Megakaryocyte).

**B-** Clonogenic capacity of primary CD34<sup>+</sup> cells from 15 diagnosed CML patients, treated with DMSO (CT), 1  $\mu$ M of Alexidine alone (ALX), 1  $\mu$ M of imatinib (IMA) or combination of ALX and IMA (Combo) was examined after 14 days. \*\*\*\* p < 0.0001, 2-way ANOVA analysis.

C- Limited dilution analysis (LDA) of CML LSCs from indicated conditions by LTC-IC assay.

**D-** LTC-IC frequencies calculated from C results.

**E-** Primary CD34<sup>+</sup> cells from diagnosed CML patient, stained with 5-(and 6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester (CFSE) were cultured in StemSpan without cytokines and treated with DMSO (CT), 1  $\mu$ M of Alexidine alone (ALX), 1  $\mu$ M of imatinib (IMA) or combination of ALX and IMA (Combo).

Cells were harvested at variable time points and labeled with anti CD45 and anti-CD34 before evaluation of DAPI+ cells by cytometric analysis.

**F-** Cord blood CD34+ cells were transduced with a lentiviral vector expressing or not (eGFP) BCR-ABL (eGFP-BCR-ABL). The clonogenic capacity of cells was examined after 14 days of treatment with DMSO (CT), 1  $\mu$ M of Alexidine alone (ALX), 1  $\mu$ M of Imatinib (IMA) and combination of ALX and IMA (Combo). Error bars represent SD for 3 biological replicates. \*\*\* p < 0.001, 2-way ANOVA analysis.







Figure 2

# Figure 2. Combinations of ALX and Imatinib inhibit proliferation and induce cell death of K562 cells

**A-** Proliferation curves of K562 cells treated with DMSO (CT), 1µM of Alexidine (ALX), 1µM of Imatinib (IMA), or combination of ALX and IMA (Combo) for 48 hours. Time-lapse analysis of phase contrast K562 cells using the IncuCyte system. Graphs show quantification of cell number from phase contrast confluence counting. Data are the mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\* p < 0.001, 2-way ANOVA analysis. A.U. arbitrary unit.

**B-** Clonogenic analysis of K562 cells treated for 7 days with vehicle (CT), 1 $\mu$ M of Alexidine (ALX), 1 $\mu$ M of Imatinib (IMA), or combination of ALX and IMA (Combo). \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.05 one-way ANOVA analysis.

**C-** Cell death 3D graphs (left panel) of K562 cells treated with indicated doses of ALX and IMA after DAPI staining. Cell death is expressed as the percentage of control. The most valuable ALX/IMA combination is represented by the red histogram and was used for all others experiments.

**D-** Synergy density plot displaying the distribution of synergy and dose-response matrix (right panel) of K562 cells after ALX/IMA treatments. Combination scores are represented from green (antagonism) to red (strong synergy) following a color gradient. On dose-response matrix, % of cell death is represented following a color gradient from low to high cell death.



DAPI



#### Figure 3. Combinations of ALX and Imatinib induce apoptosis events in K562 cells.

**A-** K562 cells were stimulated or not with 1µM of Alexidine (ALX) in combination or not with 1µM of Imatinib (IMA) for 24 hours. Cytometry analysis after Annexin V/DAPI labelling (Left panel). Histograms for Annexin V+ DAPI+ cells (Top right panel) and Annexin V+ DAPI- cells (Bottom right panel). \*\*\*\* p < 0.0001, 2-way ANOVA analysis

**B-** K562 cells were stimulated or not with  $1\mu$ M of Alexidine (ALX),  $1\mu$ M of imatinib (IMA), or combinations (Combo) for indicated time. Cell lysates were analyzed by immunoblotting for indicated proteins.

**C-** K562 cells were incubated 45 minutes in the presence or not of 30  $\mu$ M Q-VD-OPh. Cells were then incubated 24 hours with the indicated concentration of Alexidine '(ALX).

Α **GFP-K562** GFP Treatment remaining cells NSG D0 D1 D14 D36 В С 0.60 ALX PBS IMA 0.55 Weight (g) 0.50 0.45 0.40 IMA AO ۔ ک ۲ ه. م. D 31:90 S **50**:32 **18** : 29 **% GFP<sup>+</sup> : % DAPI**<sup>−</sup> **51** : 18 <mark>5</mark>:34 **30**:14 BM PBS ALX IMA Ε CT ALX 100 Percent survival IMA 50· 0+ 0 10 40 20 30

Time (days)

Figure 4

#### Figure 4. Leukemogenesis fails to restart when ALX treatment is stopped.

**A**- Schematic design of the in-vivo experiment. NSG mice (4 per group) were injected intravenously with K562-GFP transduced cells. One day after, each mouse was treated intraperitoneally either with Alexidine (0,5 mg/kg), Imatinib (45 mg/kg) or PBS (Vehicle) every day for 14 days. All mice died or were sacrificed prior the end of the protocol (Day 36). Bone marrows and spleen cells were collected prior flow cytometry analysis to quantify remaining GFP cells.

**B**- NSG mice spleens were collected after mice sacrifice and measured. Pictures are representative of 4 spleens per condition.

**C**- Quantification of weighted spleens (unit = g).

D- Schematic quantification of flow cytometry analysis. The percentage of GFP remaining cells is in displayed in green, and the percentage of DAPI- neg cells among GFP ones are in black.
S = Spleen, BM= Bone Marrow.

**E**- Survival curves of NSG mice intravenously injected with K562-GFP cells and treated one day later with either vehicle (PBS 1X), Alexidine (0.5 mg/kg) or Imatinib (45 mg/kg) once per day for 14 days.








Figure 5

# Figure 5. Alexidine and Chlorexidine display differencial inhibition of the mitochondrial respiratory chain over time.

K562 cells were pre-treated either with 1µM Alexidine (ALX), 2µM Chlorexidine (CLX) or left untreated for respectively 2 (**A**), 4 (**B**), 6 (**C**) and 18 hours (**D**). Oxygen Consumption Rate (OCR) was evaluated with Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyser with Mitostress test after injection with 1µM Oligomycin (O), 0,5 µM FCCP and 1 µM of both Rotenone (R) and Antimycin A (A). Quantification of Basal, Maximal respiration and ATP-coupled OCR Production are shown in indicated histograms. Data are expressed as mean  $\pm$  SD representative of 3 independent experiments performed in quadruplicate.



В



Figure 6

# Figure 6. Alexidine induces energetic stress by inhibition of mitochondrial respiratory chain in both Imatinib-sensitive and -resistant K562 cell lines.

**A**- Imatinib-sensitive K562 cells (K562-S, Top) and Imatinib-resistant K562 cells (K562-R, Bottom) were pre-treated either with 1 $\mu$ M Alexidine (ALX), 1 $\mu$ M Imatinib (IMA) or left untreated for 20 hours. Oxygen Consumption Rate (OCR) was evaluated with Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyser with Mitostress test after injection with 1 $\mu$ M Oligomycin (O), 0,5 $\mu$ M FCCP and 0,5 $\mu$ M of both Rotenone (R) and Antimycin A (A). Quantification of ATP-coupled OCR Production, Basal and Maximal respiration are shown in the indicated histograms. Data are expressed as mean  $\pm$  SD representative of 3 independent experiments performed in quadruplicate.

**B**- K562S and K562R cells were stimulated with  $2\mu$ M of Alexidine (ALX),  $1\mu$ M of imatinib (IMA) from 0 up to 48 hours. Cell lysates were analyzed by immunoblotting for P-AMPK $\alpha$  (Thr172) and the total AMPK.



С



Figure 7

# Figure 7. Combinations of ALX and 2-DG induce cell death and inhibit clonogenicity of K562 cells.

**A**- Cell death 3D graphs (left panel) of K562 cells treated with indicated doses of ALX and 2deoxyglucose (2-DG) after DAPI staining. Cell death is expressed as the percentage of control.

**B**- Synergy density plot displaying the distribution of synergy and dose-response matrix (right panel) of K562 cells after ALX/2-DG treatments. Combination scores are represented from green (antagonism) to red (strong synergy) following a color gradient. On dose-response matrix, % of cell death is represented following a color gradient from low to high cell death.

**C**- Clonogenic analysis of K562 cells treated for 7 days with vehicle (CT), 1 $\mu$ M of Alexidine (ALX), 5mM of 2-DG, or combination of ALX and 2-DG (Combo). \*\* p < 0.05 one-way ANOVA analysis. Data are representative of 3 independent experiments performed in triplicate.



Figure 8

### Figure 8. ALX overcomes Imatinib resistance in CML cell lines.

**A-B-** K562-R (A) and LAMA-84R (B) cells were treated with indicated doses of Alexidine (ALX), and Imatinib (IMA) after DAPI staining. Cell death 3D graphs (left panels) of cells Cell death is expressed as the percentage of control. The best synergy combinations inducing up to 80% of cell death are represented by the red histograms and were used for all others experiments. Synergy density plot displaying the distribution of synergy and dose-response matrix (right panels) of cells after ALX/TKI treatments. Combination scores are represented from green (antagonism) to red (strong synergy) following a color gradient. On the dose-response matrix, the % of cell death is represented following a color gradient from low to high cell death.

**C-** CD34+ cells from bone marrow of Imatinib-non-responder patients are enriched after magnetic sorting, plated on methylcellulose for CFU assay and treated with  $1\mu$ M of ALX,  $1\mu$ M of Imatinib or both for 14 days.

**D-** Co-Culture model to study stromal mediated resistance. K562-GFP cells are seeded on M2-10B4 mCherry stromal cells for 3 days and treated 48h with indicated concentrations of ALX and/or IMA. Cell death is then evaluated by DAPI incorporation on K562-GFP cells by flow cytometry.



Figure S1

### Figure S1. Combinations of ALX and TKIs inhibit clonogenicity of CD34+ CML cells.

Clonogenic capacity of primary CD34<sup>+</sup> cells from 3 diagnosed CML patients, treated with DMSO (CT), 1  $\mu$ M of Alexidine alone (ALX), 2nM of Dasatinib (DASA), 2nM of Nilotinib (NILO), 2nM of Bosutinib (BOSU), 2nM of Ponatinib (PONA) or combinations of ALX and each TKI was examined after 14 days.



Figure S2

### Figure S2. Combinations of ALX and BCR-ABL inhibitors induce cell death of K562 cells

Cell death 3D graphs (left panel) of K562 cells treated with indicated doses of Alexidine (ALX), Dasatinib (DASA), Nilotinib (NILO), Bosutinib (BOSU) or Ponatinib (PONA) after DAPI staining. Cell death is expressed as the percentage of control. The best synergy combinations inducing up to 80% of cell death are represented by the red histograms and were used for all others experiments. Synergy density plot displaying the distribution of synergy and dose-response matrix (right panel) of K562 cells after ALX/TKI treatments. Combination scores are represented from green (antagonism) to red (strong synergy) following a color gradient. On the dose-response matrix, the % of cell death is represented following a color gradient from low to high cell death.







# Figure S3. Combinations of ALX and Imatinib inhibit proliferation and induce cell death of LAMA-84 cells

**A-** Cell death 3D graphs (left panel) of LAMA-84 cells treated with indicated doses of ALX and IMA after DAPI staining. Cell death is expressed as the percentage of control. The most valuable ALX/IMA combination is represented by the red histogram and was used for all others experiments.

**B-** Synergy density plot displaying the distribution of synergy and dose-response matrix (right panel) of LAMA-84 cells after ALX/IMA treatments. Combination scores are represented from green (antagonism) to red (strong synergy) following a color gradient. On dose-response matrix, % of cell death is represented following a color gradient from low to high cell death.

**C-** LAMA-84 cells were stimulated or not with 1µM of Alexidine (ALX), 1µM of imatinib (IMA), or combinations (Combo) for indicated time. Cell lysates were analyzed by immunoblotting for indicated proteins.

Au cours de mon travail de thèse j'ai également contribué à la rédaction d'un article de revue générale dans le domaine des CSLs intitulé « Druggable Biochemical Pathways and Potential Therapeutic Alternatives to Target Leukemic Stem Cells and Eliminate the Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia » publiée dans la revue International Journal of Molecular Sciences en 2019.



Review

## Druggable Biochemical Pathways and Potential Therapeutic Alternatives to Target Leukemic Stem Cells and Eliminate the Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia

### Fabien Muselli<sup>(D)</sup>, Jean-François Peyron and Didier Mary \*<sup>(D)</sup>

Université Côte d'Azur, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, CEDEX 3, 06204 Nice, France; fabien.muselli@univ-cotedazur.fr (F.M.); jean-francois.peyron@univ-cotedazur.fr (J.-F.P.)

\* Correspondence: didier.mary@univ-cotedazur.fr

Received: 18 October 2019; Accepted: 7 November 2019; Published: 10 November 2019



**Abstract:** Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a disease arising in stem cells expressing the BCR-ABL oncogenic tyrosine kinase that transforms one Hematopoietic stem/progenitor Cell into a Leukemic Stem Cell (LSC) at the origin of differentiated and proliferating leukemic cells in the bone marrow (BM). CML-LSCs are recognized as being responsible for resistances and relapses that occur despite the advent of BCR-ABL-targeting therapies with Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs). LSCs share a lot of functional properties with Hematopoietic Stem Cells (HSCs) although some phenotypical and functional differences have been described during the last two decades. Subverted mechanisms affecting epigenetic processes, apoptosis, autophagy and more recently metabolism and immunology in the bone marrow microenvironment (BMM) have been reported. The aim of this review is to bring together the modifications and molecular mechanisms that are known to account for TKI resistance in primary CML-LSCs and to focus on the potential solutions that can circumvent these resistances, in particular those that have been, or will be tested in clinical trials.

**Keywords:** chronic myeloid leukemia; leukemic stem cells; resistance; tyrosine kinase inhibitors; microenvironment; apoptosis; autophagy; metabolism; epigenetic; clinical trials

#### 1. Introduction

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm characterized by a chromosomic translocation between chromosomes 9 and 22 at a very early stem/progenitor cell level, with the emergence of the well-known chromosome of Philadelphia. The oncogenic event fuses parts of the gene for the c-ABL tyrosine kinase downstream of the *BCR* gene. This creates the constitutively active BCR-ABL tyrosine kinase, at the root of the disease. BCR-ABL supports initiation and progression of CML through a plethora of signaling pathways [1]. If left untreated, CML rapidly evolves from a chronic phase into a blast crisis with a massive accumulation of myeloid cells in the BM and the blood. This uncontrolled proliferation of Philadelphia positive cells (Ph+) supplants normal hematopoiesis, with a gradual replacement of normal blood cells.

The very first treatments developed with Hydroxyurea, Busulfan or Interferon-Alpha (IFN- $\alpha$ )-based therapies have shown their limitation to affect BCR-ABL proliferative cells and thereby to keep the disease in check [2]. CML was the first cancer to benefit from a targeted therapy in the early 2000s with STI571/Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor (TKI), that specifically blocks ABL activity. This treatment dramatically improved the therapeutic outcome of the patients, with 95% of them achieving a complete hematological remission (CHR) [3]. Furthermore, second- (Dasatinib/BMS354825,



Nilotinib/AMN107, Bosutinib/SKI-606) and third- (Ponatinib/AP24534) generation TKIs have been designed to bypass primary and secondary resistances to Imatinib [4]. The rise of these TKIs has drastically improved CML patients' outcome and survival, redefining CML from an incurable disease to a manageable one. While TKIs, especially the second-generation ones, are very efficient to eliminate blasts, they remain nonetheless toxic for healthy cells in the long run with numerous side effects affecting the gastrointestinal tract or the cardiovascular system [5].

A discontinuation of Imatinib has therefore been tested once the disease is undetectable at the molecular level. Unfortunately, half of the patients in this study relapsed within two years [6], supporting the idea of a residual disease sustained by a discrete population of Leukemic Stem Cells (LSCs), that are insensitive to treatments, capable to self-maintain and to reinitiate the disease in the long-term. Therefore, successfully achieving a cure requires the elimination of LSCs. Most of the time, LSCs are in a quiescent state in the bone marrow (BM) and thus insensitive to TKI monotherapy. This is why during the last decade, many research groups have been deciphering the pathways involved in LSC maintenance and expansion, to propose numerous pertinent approaches to eradicate them specifically.

Most dysregulations connected to TKI resistance in CML are exclusively observed on cell lines, but some of them were also found in primary CD34<sup>+</sup> CML cells.

The present review is focused on TKI-resistance processes observed ex-vivo for which pharmacological targeting has been demonstrated to resensitize LSCs to TKIs (Table 1) eventually given rise to clinical trials (Table 2), summarized in a global overview (Figure 1).

Scheme Number	Treatment 1	Treatment 2	Pathway	References
1	Ponatinib	Asciminib	BCR-ABL1 allosteric inhibitor	[7]
	Imatinib			
2	Dasatinib	GSK343	EZH2 inhibitor	[8]
	Nilotinib			
3	Imatinib	LBH589	HDAC inhibitor	[9]
4	Nilotinib	LBH589	HDAC inhibitor	[10]
5	Imatinib	LAQ824	HDAC inhibitor	[11]
6	Imatinib	Hydralazine and Magnesium Valporate	HDAC inhibitors	[12]
7	Imatinib	Tenovin-6	SIRT1 inhibitor	[13]
8	Nilotinih	TV39OH	SIRT1 inhibitor	[10]
9	Imatinih	miR30a inhibition	Genetic repressor/activator	[15]
10	Imatinib	miR-202 overexpression	Inhibition of hexokinase 2 (HK2) and glycolysis	[16]
10	Imatinib	miR-486	Genetic repressor/activator	[17]
12	Imatinib	Ovatodiolide	miR-155 upregulation/PI3K/mTOR inhibition	[17]
13	Imatinib	RI-BPI	BCI 6 inhibitor	[10]
10	Imatinib	FX1	BCL6 inhibitor	[20]
15	Imatinib	A-1210477	MCL-1 inhibitor	[20]
16	Dasatinib	Sabutoclax	Pan-BCL2 inhibitor	[21]
17	Imatinih	ABT-737	BCL2 and Bcl-xL inhibitor	[22 23]
17	mathio	Nutlin3a	MDM2 inhibitor	[22,20]
18	Nilotinib	ABT-737	BCL2 and Bcl-xL inhibitor	[24]
19	Imatinib	DS-5272	MDM2 inhibitor	[25]
20	Imatinib	ABT-199 (Venetoclax)	BCL2 inhibitor	[26]
20	Nilotinib	ABT-199 (Venetoclax)	BCL2 inhibitor	[27]
	Imatinib	Tible 199 (Venetoeunit)	Delle Innonor	[]
22	Nilotinib	Chloroquine	Autophagy inhibitors	[9 28]
	Dasatinib	Bafilomycin A1	Theophiligy Indicators	[)=0]
23	Imatinib	Chloroquine Bafilomycin A1	Autophagy inhibitors	[29]
	Imatinib	Damonty chi i i		
24	Nilotinib	Clarithromycin	Autophagy inhibitor	[30]
	Dasatinib			[]
25	Imatinib	Spautin-1	Autophagy inhibitor	[31]
26	Ponatinib	Vismodegib (GDC-0449)	Smo antagonist Hedgehog pathway	[32]
27	Nilotinib	Lys05	Autophagy inhibitor	[33]

**Table 1.** Chronic Myeloid Leukemia (CML) Treatments with Ex-Vivo Evidences of Effectiveness either in Combination with tyrosine kinase inhibitor (TKIs) or Alone.

Scheme Number	Treatment 1	Treatment 2	Pathway	References
28	Nilotinih	DIK III	VPS34 inhibitor	[22]
20	INHOULID	T IK-III	Autophagy	[55]
29	Imatinib	PTC-209	BMI1 inhibitor	[34]
30	Nilotinib	WNT974	PORCN selective inhibitor	[35]
			Wnt pathway	[]
31	Nilotinib	PRI-724	CBP inhibitor	[36]
		VI 990	wnt/β-catenin inhibition	
32	Nilotinib	P428	AXL inhibitors	[37]
33	Imatinih	Plerifayor (ADM3100)	CXCR4 antagonist	[34]
00	Imatinib	Tielilaxof (Tiblio100)	CACAT unugonist	
34	Nilotinib	Plerifaxor (ADM3100)	CXCR4 antagonist	[38]
35	Nilotinib	Plerifaxor (ADM3100)	CXCR4 antagonist	[39]
36	Imatinib	BTK140	CXCR4 antagonist	[40]
37	Imatinib	Filgotinib Itacitinib	IAK1 specific inhibitors, IAK1/STAT3 pathway	[41]
38	Imatinib	Wogonin	STAT5 pathway inhibitor	[42]
20	T (1 1		Mitochondrial ribosome protein translation and	[ [ [ ]
39	Imatinib	ligecycline	respiratory chain	[43]
40	Nilotinib	SR18292	PGC-1α inhibitor/SIRT1 pathway inhibition	[14]
41	Imatinib	T C	TOD 11	
41	Dasatinib	Ivermectin	mTOK inhibitor	[44]
42	Imatinib	Anti-CD70	Wnt/β-catenin inhibition	[45]
13	Imatinih	Sonidarih (LDE225)	Smo antagonist	[46]
43	maunib	Sofildegib (EDE223)	Hedgehog pathway inhibition	[40]
44	Imatinib	Ly364947	TGF-βRI inhibitor TGFβ/Activin/NODAL pathway	[47]
	Imatinib			
45	Dasatinib	EW-7197	TGF-β signaling inhibitor	[11]
	Ponatinib			
46	Dasatinib	BMS-911543	JAK2 inhibitor	[48]
47	Dasatinib	Niclosamide	ERK/MNK1/eIF4E pathway inhibition	[49]
48	Imatinib	SB216763	GSK-3 specific inhibitor	[50]
40	Imatinib	PD146176	15-LO inhibition/ arachidonic acid -leukotriene pathway	[51]
49	Nilotinib	1 D140170	inhibition	[51]
50	none	EZH2 CRISPR/Cas9 invalidation	EZH2 inhibition	[52]
51	none	Pracinostat	HDAC inhibitor	[53]
52	none	PI-68	Methyltransferase inhibitor (PRMT5)	[54]
52	none	1) 00	Wnt/β-catenin pathway inhibition	
53	none	Dactolisib (BEZ235)	PI3K/mTOR inhibitor	[55]
00	none	Chloroquine	Autophagy inhibitor	[00]
54	none	Vismodegib (GDC-0449)	Smo antagonistHH pathway inhibition	[56]
55	none	Resveratrol	Autophagic cell death induction	[57]
56	none	IFN-α	MHC II increased expression	[58]
		Ruxolitinib	JAK1/2 inhibitor	[]
			Mitochondrial ROS and oxidative	
57	none	shATG7	phosphorylation increase	[59]
-		·D 00/	Autophagy inhibition	1.001
58	none	miR-326 overexpression	Downregulation of SmoHH pathway inhibition	[60]
59	none	PD184352	MEK specific inhibitor	[61]
(0		BM5-21462	Farnesyl transferase inhibitor	
60	none	CGP57380	MINKI INHIBITOR EKK/MNK1/eIF4E pathway inhibition	[62]
61	none	LY255283	BL12 inhibitor/arachidonic acid -leukotriene	[63]
		DC7110 7000	pathway inhibition	
62	none	KG/112//388 CDL 202/0(10	HMD2 inhibitors (p53 inhibition)	[64]
		CP1-203/0610	BET inhibitors (c-Myc inhibition)	

Table 1. Cont.

Scheme Number	Treatment 1	Treatment 2	Pathway	Investigation	Phase	Identifier	First Posted	Status
1	Imatinib Nilotinib Dasatinib	Asciminib	BCR-ABL1 allosteric inhibitor	Frontline combination in CP- CML	П	NCT03906292	2019	Recruiting
2	none	Asciminib	BCR-ABL1 allosteric inhibitor	Efficacy of ABL001 versus Bosutinib in CP-CML patients previously treated with TKIs	III	NCT03106779	2017	Recruiting
3	Dasatinib	Asciminib	BCR-ABL1 allosteric inhibitor	Combination in CML in lymphoid blast crisis	I	NCT03595917	2018	Recruiting
4	Imatinib Imatinib	Asciminib	BCR-ABL1 allosteric inhibitor	Efficacy and safety of combination in patients with CP-CML	Π	NCT03578367	2018	Recruiting
5	Nilotinib Dasatinib	Asciminib	BCR-ABL1 allosteric inhibitor	Oral ABL001 in CML Patients	Ι	NCT02081378	2014	Recruiting
6	Imatinib	Cytarabine	DNA synthesis inhibitor	Combination in patients with CML	II	NCT00022490	2003	Terminated
7	Imatinib	Cytarabine	DNA synthesis inhibitor	Combination in patients with CML	I/II	NCT00015834	2003	Completed
8	Dasatinib	SAHA (Vorinostat)	HDAC inhibitor	Combination in treating patients with accelerated phase or BP- CML	Ι	NCT00816283	2009	Completed
9	Imatinib	Panobinostat (LBH589)	HDAC inhibitor	Safety and tolerability of LBH589 combined with imatinib in CML patients in MCR	Ι	NCT00686218	2008	Completed
10	Imatinib	Decitabine	DNA methyltransferase inhibitor	Combination in patients with CML	II	NCT00054431	2003	Completed
11	Dasatinib	Venetoclax	BCL2 inhibitor	Combination in treating patients with BCR-ABL1 positive early chronic phase	11	NCT02689440	2016	Recruiting
12	Ponatinib	Venetoclax Dexamethasone	Anti-inflammatory	Triple combination in BCR-ABL positive relapsed CML	I/II	NCT03576547	2018	Recruiting
13	Imatinib	Oblimersen	oligodeoxynucleotide	Oblimersen and Imatinib in treating patients with CML	Π	NCT00049192	2003	Completed
14	Imatinib	Hydroxychloroquine	Autophagy inhibitor	Effectiveness of combination on BCR/ABL levels in CML patients in MCR	II	NCT01227135	2010	Unknown
15	Imatinib	Everolimus (RAD001)	mTOR inhibitor	Combination in patients in CP-CML who are not in CCR after previous Imatinib	I/II	NCT00093639	2004	Completed
16	Imatinib	Temsirolimus	mTOR inhibitor	Temsirolimus and Imatinib in treating patients with CML	I	NCT00101088	2005	Terminated
17	Dasatinib	PF04449913 (Glasdegib)	Smo antagonist HH inhibition	Study of PF-04449913 in select hematologic malignancies	Ι	NCT00953758	2009	Completed
18	Imatinib	Interferon-α	Immunomodulatory effect	INF- $\alpha$ and Imatinib in CML patients	II	NCT00045422	2003	Completed
19	Imatinib	Pioglitazone	PPARγ agonist STAT5 inhibition	Combination in patients with relapsed CML	Π	NCT02767063	2016	Terminated
20	Imatinib	Pioglitazone	PPARγ agonist STAT5 inhibition	Efficiency of combination to treat CML	п	NCT02687425	2016	Unknown
21	TKIs	Pioglitazone	PPARγ agonist STAT5 inhibition	Pioglitazone and TKI in patients with relapsed CML	П	NCT02730195	2019	Terminated
22	Dasatinib	Cyclosporine	IL-2 inhibitor	Combination in patients with CML refractory or intolerant to imatinib	Ι	NCT01426334	2011	Terminated
23	Pioglitazone	Avelumab (Anti-PD-L1)	PPARγ agonist STAT5 inhibition PD-1/PD-L1 inhibition	Therapies in combination or sequentially with TKIs in CP-CML patients in CCR (ACTIW)	I/II	NCT02767063	2016	Recruiting
24	Imatinib Nilotinib Dasatinib	Pembrolizumab (Anti-PD-1)	PD-1/PD-L1 inhibition	Pembrolizumab and TKIs in CML patients with persistently detectable MRD	П	NCT03516279	2018	Recruiting
25	Dasatinib Nilotinib	Ruxolitinib	JAK1/2 selective inhibitor	Ruxolitinib phosphate and Dasatinib or Nilotinib in treating CML patients	П	NCT03654768	2018	Recruiting
26	Nilotinib	Ruxolitinib	JAK1/2 selective inhibitor	Ruxolitinib in treating participants with CML with MRD after TKIs	I/II	NCT01751425	2012	Active, not recruiting
27	Nilotinib	Ruxolitinib	JAK1/2 selective inhibitor	Nilotinib/Ruxolitinb therapy for TKI resistant Ph-Leukemia	I//II	NCT01914484	2013	Unknown

Table 2. Clinical Trials Involving CML Patients Treated either with Investigational Molecules in Combination with TKIs or Alo
---

#### Table 2. Cont.

Scheme Number	Treatment 1	Treatment 2	Pathway	Investigation	Phase	Identifier	First Posted	Status
28	Nilotinib	Ruxolitinib	JAK1/2 selective inhibitor	Combination in CP-CML Patients	Ι	NCT01702064	2012	Completed
29	Nilotinib	Peginterferon α2b	Immunomodulatory effect	Evaluation of TKI and INF- $\alpha$	III	NCT01657604	2012	Active, not recruiting
30	Imatinib Nilotinib	Peginterferon α2b	Immunomodulatory effect	Imatinib or Nilotinib with Pegylated Interferon- $\alpha 2b$ in CML	П	NCT00573378	2007	Withdrawn
31	Dasatinib	Peginterferon α2b	Immunomodulatory effect	Safety and efficacy of combination in newly diagnosed CML (NordCML007)	П	NCT01725204	2012	Completed
32	Bosutinib	Ropeginterferon	Immunomodulatory effect	Long-acting low dose Ropeginterferon for CML treated with Bosutinib from diagnosis	Π	NCT03831776	2019	Recruiting
33	Nilotinib	Sonidegib (LDE225)	Smo antagonist HH inhibition	Combination in CML patients who developed resistance to prior therapy	Ι	NCT01456676	2011	Completed
34	Dasatinib	BMS-833923	Smo antagonist HH inhibition	Combination therapy in CML	I/II	NCT01218477	2010	Completed
35	Dasatinib	BMS833923	Smo antagonist HH inhibition	Dasatinib combo with Smo antagonist	п	NCT01357655	2011	Terminated
36	Dasatinib	PF04449913	Smo antagonist HH inhibition	Study in select hematologic malignancies	Ι	NCT00953758	2009	Completed
37	Imatinib	Zarnestra	Farnesyltransferase inhibitor	Zarnestra and Gleevec in CP- CML	Ι	NCT00040105	2002	Completed
38	Imatinib	Lonafarnib	Farnesyltransferase inhibitor	Lonafarnib and Gleevec in CML	Ι	NCT00047502	2002	Completed
39	none	Sorafenib (BAY43-9006)	Raf/VEGFR/PDGFR inhibitor	Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 in CML patients resistant to Gleevec	П	NCT00661180	2008	Completed
40	Imatinib	Vatalanib (PTK 787)	VEGFR inhibitor	Combination in patients with BP-CML	I/II	NCT00088231	2004	Completed
41	Dasatinib	BP1001	Grb2 inhibitor	Combination of liposomal Grb2 antisense oligonucleotide with Dasatinib in CML patients	I/II	NCT02923986	2016	Recruiting
42 43	none Dasatinih	MK0457 MK0457	Aurora kinase inhibition	MK0457 in CML patients (0457-003) Evaluation of afficacy and safety in patients with CML	I	NCT00111683	2005 2007	Completed Terminated



**Figure 1.** Chronic Myeloid Leukemia (CML) Leukemic Stem Cells (LSC) pathways involved in tyrosine kinase inhibitor (TKI) resistance and potential therapeutic targets to impair them. LSC (in the center) is represented within its microenvironment and key interactions with different bone-marrow cells are shown. This figure is coupled with Table 1 for ex-vivo candidate molecules (yellow tags) and Table 2 for clinical trials involving candidate molecules (green tags) with their respective mode of action (red symbols).

#### 2. Leukemic Stem Cells: Cannot See the Wood for the Trees

LSCs were first identified in Acute Myeloid Leukemia (AML) within the CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> cell population and defined as cells that can engraft and initiate AML in a NOD/SCID immunodeficient host mouse [65]. They have the ability to self-renew and also to produce differentiation-impaired leukemic blasts [65]. LSCs have also been described in other leukemias such as CML [66] or B-lineage acute lymphoblastic leukemia [67], and Cancer Stem Cells (CSCs) have been identified in numerous solid cancers such as breast [68], colorectal [69] or brain [70] cancers, unravelling their crucial importance in cancerology.

LSCs that also referred as Leukemia-Initiating Cells (LICs), represent a very small subset of CML cells, residing in the very complex microenvironment of the BM. Contrary to proliferating leukemic cells, LSCs have been shown to be "BCR-ABL oncogene independent" as demonstrated by their capacity to maintain and reinitiate the disease even after BCR-ABL activity has been shut down in the SCLtTA/BCR-ABL double transgenic CML mouse model [71]. Furthermore, despite a continuous inhibition of BCR-ABL by TKIs (Imatinib, Dasatinib or Nilotinib), primary CML stem/progenitors are able to self-maintain in the presence of a cocktail of cytokines [72]. Since LSCs emerge from HSCs, the two types of cells cannot be formerly distinguished from each other from their phenotype. The direct identification of LSCs and evaluation of their numbers in BM or blood sample is not feasible yet, and the gold standard model to study LSCs remains the serial transplantation in recipient mice, of samples containing LSCs, followed by monitoring the development of leukemia [73].

Many studies have found that specific biochemical dysregulations in LSCs can contribute to their resistance to TKI treatments, resulting in their persistence in the bone marrow microenvironment (BMM). It is currently accepted that bi-therapies combining TKIs with various drugs that target these dysregulations could lead to elimination of LSCs.

#### 3. BCR-ABL Dependent and Independent Resistances

#### 3.1. BCR-ABL-Dependent Resistances and Alternative Solutions

Emergence of point mutations in BCR-ABL, essentially in the different structural domains of ABL1: Phosphate-binding loop (P-loop), Activation-loop (A-loop), SRC Homology 2/3 Domain (SH2/SH3) and catalytic domains represent the most encountered forms of BCR-ABL-dependent resistances [74]. They are usually the consequence of long-term adaptation of leukemic cells upon TKI treatments. Those mutations are mostly single ones although double mutants have also been identified, with some of them refractory to all TKIs. Some mutations can confer resistance to some or to all TKIs. For instance, the gatekeeper mutations affecting threonine 315: T315I and T315V are only sensitive to Ponatinib, the third generation of TKIs. As the disease progresses towards accelerated or blast crisis phases, genomic instabilities can favor double mutations on BCR-ABL such as T315I/G250E, T315I/Q252H, T315I/Y253H, T315I/E255V, T315I/F311, T315I/M351T, T315I/F359V, T315I/H396R or T315I/E453K which are associated with poor prognosis as most of them generate insensitivity to all available TKIs [75].

Imatinib, the first synthetized TKI, targets the ATP binding site of the AB1 catalytic domain in a type-II-dependent fashion, stabilizing the catalytically inactive conformation of the kinase to induce apoptosis of CML cells. The emergence of 2nd generation TKI was a necessity to treat first-line-Imatinib refractory patients and Dasatinib, Nilotinib and Bosutinib were developed to solve this issue. Dasatinib is a type-I kinase inhibitor (only affecting the catalytically active conformation) while the two other TKIs are type-II kinase inhibitors like Imatinib. In an attempt to treat BCR-ABL T315I refractory patients, Ponatinib was developed to target the active conformation of T315I BCR-ABL using a structure- design strategy. However, some BCR-ABL double mutants still appeared resistant to Ponatinib [75]. Asciminib is the last developed TKI and also the first allosteric BCR-ABL inhibitor that is effective against any mutation in the ATP binding site [76]. Furthermore, combination of Asciminib with Ponatinib is highly efficient against BCR-ABL compound mutants [7]. Indeed, this molecule is currently in five recruiting clinical trials (NCT03906292, NCT03106779, NCT03595917, NCT03578367 and NCT02081378).

In addition to *BCR-ABL* point mutations, a higher expression of BCR-ABL can induce TKI resistance as observed for CD34<sup>+</sup>/BCR-ABL<sup>HIGH</sup> expressing cells [77]. In the same way, the genomic instability that goes with CML progression towards late phases further increases the occurrence of BCR-ABL mutations. Furthermore, BCR-ABL is known to trigger DNA damages (double-strand breaks) via reactive oxygen species (ROS) stimulation [78] linked to PI3K/mTOR activation [79], which further increases mutagenesis by promoting the emergence of additional mutations.

#### 3.2. BCR-ABL-Independent Resistances

Targeting DNA synthesis with the anti-metabolite cytarabine (NCT00022490, NCT00015834) has been first considered as a broad approach to counteract BCR-ABL-independent resistances in CML. During the last two decades, the description at a molecular level of diverse BCR-ABL-independent resistance mechanisms, led to the identification of dysregulated signaling pathways in LSCs. Those dysregulations have paved the way for precise pharmacological interventions to resensitize resistant CML cells to TKIs, even in the case of the T315I "hell" mutation. Several examples are presented below with a specific focus on mechanisms allowing the maintenance of CML-LSCs, and for most cases, on potential therapeutic molecules to target them.

#### 3.2.1. Drug Transporters

LSCs resistance to chemotherapies or TKIs can be partly explained by the high expression of different members of the ATP-binding cassette (ABC) family of transporters able to export out of cancer cells a wide range of molecules, thereby decreasing their therapeutic potential. The high expression of ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein), ABCC1 (multidrug resistance protein, MRP1) and ABCG2 (breast cancer resistance protein; BCRP) transporters confers multidrug resistance (MDR) to LSCs. For example, ABCG2 has been shown to efflux Imatinib from cells [80] and to control its delivery in-vivo [81]. Efflux-mediated resistance was shown not to be specific to Imatinib but also to apply to other TKIs [82].

#### 3.2.2. Targeting Epigenetic Dysregulation in CML

Epigenetic modifications at the chromatin control gene expression during proliferation and differentiation of stem cells. Interestingly, an abundant literature reports that the epigenetic signature of cancer stem cells is quite different from their normal counterpart highlighting that an altered epigenetic program may play an important role in cancer progression.

Because numerous epigenetic mechanisms have been reported to be altered during CML progression [83,84] or reprogrammed after TKI therapy [85], their modulation has to be considered in order to counteract with resistance as a means of eradicating residual disease [86].

Proteins of the polycomb family that are part of the Polycomb Repressive Complexes 1 and 2 (PRC1/PRC2) function as repressors of gene expression via chromatin modifications [87]. These two complexes have been involved in the progression of both solid tumors and hematological malignancies [88]. Their epigenetic regulatory function can be affected by alterations in the genes coding for the different components of each complex or through regulation of associated protein partners.

BMI1 a polycomb protein, part of the PRC1 complex, plays an important role in supporting self-renewal of both HSC and LSCs [89]. While there is no clear demonstration of the involvement of BMI1 in CML initiation, the polycomb clearly cooperates with BCR-ABL when introduced in CD34<sup>+</sup> CML cells to stimulate their proliferation and self-renewal [90]. Furthermore, BMI1 was shown to be overexpressed in CML vs control subjects [91] with an increased expression that mirrors disease progression [91,92] and could thus represent a molecular marker for CML prognosis prediction [93] Moreover, BMI1 could be a potential target. Indeed, CD34<sup>+</sup> CML cells treated with the BMI1 inhibitor PTC-209, failed to achieve clonogenicity [92] leaving hope for a possible targeting of LSCs.

EZH2, another important polycomb protein, member of the PRC2 complex, was also described as being implicated in CML-LSCs maintenance after mutation or overexpression that triggered an

epigenetic reprogramming. Targeting EZH2 by CRISPR/Cas9-mediated gene editing [52] is an efficient strategy to target LICs, and the specific inhibitor GSK343 [8] sensitizes LSCs to TKIs.

ASXL1 that associates with PRC2 is well known to regulate epigenetic marks and transcription. The *ASXL1* gene is frequently mutated in CML diagnosed-patients and often correlated with poor prognosis [94,95], suggesting a role in the progression of the disease [96,97] and could thus represent a future attractive target.

The Histone deacetylase (HDAC) family represents another class of epigenetic regulators that have been extensively described for their implication in cancer biogenesis and in cancer stem cells maintenance. In the case of CML, the first HDAC inhibitor used with success in combination with a TKI to target LSCs is the class I and II dual-HDAC inhibitor SAHA/Vorinostat (Suberoylanilide hydroxamic acid) that was found to enhance Imatinib-induced apoptosis of CD34<sup>+</sup> CML cells [98]. Other HDAC inhibitors like LBH589 can be combined with Imatinib [83], Nilotinib [10] or LAQ824 to eliminate Imatinib-refractory primary CML cells [83,99]. Furthermore, LBH589 and LAQ824 combined with a TKI gave interesting results in Imatinib-resistant CML cells harboring the BCR-ABL T315I mutation [99,100]. The class I, II and IV HDAC inhibitor Pracinostat, corrects pre-mRNA splicing of the BIM pro-apoptotic protein to overcome BIM deletion polymorphism-induced TKI resistance observed in certain CML cases [53]. Preclinical in-vitro studies have shown that the combination of Vorinostat with Dasatinib leads to the death of CML primary cells and can also attenuate the levels of expression of E255K and T315I-BCR-ABL mutants [10]. Combination of HDAC inhibitors (Hydralazine and Magnesium Valproate) with Imatinib gave promising clinical results on Imatinib non-responders [12], and several TKIs/HDAC inhibitors combinations such as Imatinib and Panobinostat (pan HDAC inhibitor): NCT00686218; or Dasatinib and Vorinostat: NCT00816283 were evaluated in clinical trials.

Among the SIRT group that is part of the HDAC family, SIRT1, a NAD-dependent deacetylase has been described, first to be overexpressed in human CML-LSCs [13] and second, to play a role in the regulation of both HSCs and LSCs [101,102]. Furthermore, Wang et al. described that histone deacetylation by SIRT1 was implicated in the acquisition of genetic mutations in *BCR-ABL* associated with TKI resistance and that targeting SIRT1 can be a good strategy to overcome these drug resistances [101]. The specific inhibition of SIRT1 by Tenovin-6 [13] or TV39OH [14] enhances p53 anti-cancer functions via increased acetylation and therefore combination with Imatinib or Nilotinib respectively leads to LSCs targeting.

Activity of promoters can be regulated by methylation-demethylation processes. The role of methylation in CML was already suspected in the pre-TKI era when silencing of cadherin 13, a mediator of calcium-dependent cell-cell adhesion, was demonstrated to correlate with response toIFN- $\alpha$  [103]. Besides, methylation can serve as a prognostic tool. Indeed, the methylation status of the BIM promoter, is associated with an unfavorable prognosis in CML diagnosed patients [104], while an increased BCR promoter methylation correlates with a more favorable response to Imatinib [105].

Otherwise, methylation of some gene promoters was reported to be implicated in CML progression like the one for SOCS1 that stimulates the JAK/STAT activity [29,106] or that of the ATP-dependent RNA helicase DDX43 [107]. Progression of the disease was also demonstrated to correlate with methylation of the promoter for genes implicated in cell-cycle progression (*p15* and *p16*) [108–110], apoptosis (*p14 ARF*) [109,110], *p53* [110] and *DAPK* [110,111]. TKI resistance has been associated with methylation of several promoters for *sFRP1* in the Wnt pathway [112], or of the Src suppressor gene *PDLIM4* [113], and of *HOXA4*. Studies in CD34<sup>+</sup> progenitor cells indicate that methylation particularly concerns tumor suppressor genes and occurs very early during CML transformation before being markedly decreased in the last phase of the disease. More recently, another study examined the DNA methylation profile of CD34<sup>+</sup>/CD15<sup>-</sup> in early CP-CML patients' cells and described 18 genes that could be aberrantly repressed upon hypermethylation and 81 upon hypomethylation [114]. This suggests that demethylating agents could be more effective in the first phase of the disease [115]. Interestingly, the PRMT5 methyltransferase, overexpressed in CML-LSCs, can be targeted with the small-molecule inhibitor PJ-68, abrogating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and leading to the elimination of LSCs [54]. Most of the molecules that modify promoter methylation have only been tested alone. Nevertheless, a phase II study that combined decitabine with Imatinib on a 28-patient CML cohort, showed an improvement in the survival for non-responder patients in advanced phase CML without BCR-ABL kinase mutation [116].

The non-coding RNAs of the long non-coding (lncRNAs) or the miRNAs families represent a recently discovered epigenetic process regulating mRNA levels and protein translation via different mechanisms [117].

Today, only few reports have emerged concerning dysregulations of lncRNAs in CML, although none have been described yet for LSCs. Nevertheless, there is some hope for the development of new therapeutic weapons in the near future. For instance, the lncRNA-HULK which is aberrantly expressed in CML, positively correlates with clinical evolution of the disease, and its down-regulation is sufficient to trigger apoptosis of leukemic cells by repression of c-MYC and BCL-2 [118]. The lncRNA-PLIN2 also upregulated in CML patients by a CEBPA induced-mechanism, increased in turn the expression of AKT, p-AKT, GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin and Axin2/conductin, and could promote tumor growth by activating GSK3 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in-vivo [119]. The expression level of lncRNA-BGL3 strongly increases following TKI treatment because of a BCR-ABL-dependent repression mechanism involving a c-MYC-dependent methylation [120]. Through its transcriptional interference activity, the lncRNA-MEG3 can regulate miR-21 expression, influencing the levels of MMP-2, MMP-9, BCL-2 and BAX and regulating proliferation and apoptosis [121].

The dysregulation of some miRNAs expression has been frequently reported in CML patients, in the last decade [122–125], presenting them as potential biomarkers [126] and opening new therapeutic options [86]. A group of 19 miRNAs was identified to predict clinical resistance to Imatinib in newly diagnosed CML [127] and more recently, 8 dysregulated miRNAs were described to be involved in the BCR-ABL-independent resistance to TKI in CML [128]. Moreover, targeting miR30a decreases autophagy and therefore sensitizes primary LMC cells to Imatinib [15], while overexpression of miR-203 overcomes TKI-resistance *in-vitro* [129]. Furthermore, overexpression of miR-202 inhibits hexokinase 2 (HK2) and glycolysis which resensitizes Imatinib-resistant CML cells [16]. Also, inhibition of miR-486, overexpressed in CML progenitors interfered with their growth and survival and sensitized them to Imatinib [17]. The inhibition of BCR-ABL by TKIs is also responsible for increased endogenous miR-126 levels, favoring LSCs quiescence and persistence [130]. Recently, a study showed that combining Imatinib with Ovatodiolide, a natural diterpenoid that up-regulates miR-155 to inhibit PI3K/mTOR, efficiently induced cell death of CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> CML cells. [18].

#### 3.2.3. Apoptosis Defects in Resistance

Numerous genes implicated in apoptotic induction were found to be repressed or mutated in CML cells such as the tumor suppressor gene *p53* [131], the pro-apoptotic members *BIM* [104] and *BAD* [132] or members of the anti-apoptotic *BCL2* family [132–135] like *BCL2*, *Bcl-xL* and *MCL1*. BCR-ABL is a potent cell death inhibitor and was demonstrated to promote CML progression by preventing formation of the caspase-9 apoptosome [136].

Targeting the BCL6/p53 axis could be one option, as BCL6 represses p53. This was achieved on primary human CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> CML stem cells using a peptide inhibitor of BCL6 (RI-BPI) [19]. TKI resistance was also described to be associated with a STAT1-dependent upregulation of BCL6 in CD34<sup>+</sup> CML stem cells and a combination of TKIs with inhibitors of BCL6 (FX1) or MCL1 (A-1210477) is sufficient to overcome this resistance in LSCs [20].

During the last decade, many studies have addressed the potential of targeting BCL2 family members in combination with one TKI, producing convincing results. The pan-BCL2 inhibitor Sabutoclax, associated with BCR-ABL inhibition with Dasatinib, rendered BM-resident blast crisis LSCs, sensitive to the TKI, suggesting a possible elimination of dormant LSCs [21]. Similarly, the BCL2/Bcl-xL inhibitor ABT-737 associated with Imatinib demonstrated strong synergism to induce cell death of both proliferating and quiescent CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> TKI-insensitive CML cell populations [22,23]. In two

other studies, a cell death response was triggered on primary CML CD34<sup>+</sup> quiescent cells by a triple combination associating ABT-737 to block BCL2 and Bcl-xL, Nilotinib to inhibit BCR-ABL and a MDM2 inhibitor such as Nutlin3a [24] or DS-5272 [25] to restore p53 activation.

Association of the BH3 mimetic ABT-199 (Venetoclax), a more specific BCL-2 inhibitor, with either Imatinib [26] or Nilotinib [27] synergistically induced death of quiescent stem/progenitor primary CML CD34<sup>+</sup> cells. Furthermore, the association of Dasatinib with ABT-199/Venetoclax will be evaluated on a phase II clinical trial (NCT02689440) that is recently recruiting. A tri-therapy combining Ponatinib, Venetoclax and Dexamethasone will also be tested in the NCT03576547 trial. Interestingly, Imatinib combined with BCL-2 antisense oligodeoxynucleotide (Oblimersen) was evaluated in a phase II clinical trial (NCT00049192).

#### 3.2.4. Role of Autophagy in CML Resistances

Autophagy enables cells to degrade and recycle their intracellular components in lysosomes, to avoid cell death, being a protective cellular response that occurs under stress conditions and in particular during nutrient depletion [137].

The first evidence of a possible role of autophagy in CML initiation and progression came with the observation that an increased autophagic response occurred in primary CML cells in response to Imatinib and that co-treatment with inhibitors (Chloroquine, Bafilomycin A1) of late stage autophagy, resulted in the elimination of phenotypically and functionally defined CML stem cells [9,28]. Since, numerous studies have demonstrated that chloroquine and other lysosomal inhibitors induce LSCs elimination [39,138]. Furthermore, the combination of hydroxychloroquine with Imatinib is being evaluated in a clinical trial (NCT01227135).

It was then reported that autophagy genes from the ATG family, such as *beclin1* and *atg5*, are overexpressed in CD34<sup>+</sup> cells from chronic-phase CML patients [139] and could be repressed by miR-30a, whose expression decreased after Imatinib treatment [15]. This suggests that the TKI treatment favors a protective autophagic process, arguing in favor of the blockade of this process to render the TKI treatment fully efficient. Carella et al. have thus demonstrated that the combination of TKIs with the antibiotic Clarithromycin, that induced accumulation of LC3-II without affecting mTOR or AKT pathways, shows remarkable responses in high-risk and advanced CML-patients [30]. Spautin-1, an autophagy inhibitor which acts on Beclin-1 expression after inactivation of VSP34-AKT complexes, was shown to enhance Imatinib-induced primary CML cells apoptosis [31]. BCR-ABL was reported to control autophagy through PI3K/AKT/FOXO4 signaling, upregulating ATF5 expression that, in turn, stimulates *mTOR* transcription [140]. In this context, the PI3K/AKT/FOXO4/mTOR pathway was suggested as a druggable axis for TKI-resistant CML patients [140]. The mTOR pathway has been targeted in the clinical trials by combining Imatinib with Everolimus (NCT00093639) and Temsorilimus (NCT00101088) respectively. The PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 used as a monotherapy, or in combination with Chloroquine, induced apoptosis in TKI-unresponsive primary CML patients' cells [55].

Interestingly, other signaling pathways involved in the regulation of CML-LSCs self-renewal such as the Sonic Hedgehog pathway (Shh) [56] and BMI1 [92], were also reported to implicate autophagy modulation. Pharmacological inhibition of the Shh pathway by the Smo antagonist Vismodegib (GDC-0449) was associated with a markedly induced autophagy of CML cells whose simultaneous inhibition potently killed Imatinib-sensitive and -resistant BCR-ABL+ cells [56]. In addition, Vismodegib combined with Ponatinib, eliminated therapy-resistant T315I BCR-ABL cells [32]. The other Shh inhibitor PF04449913 associated with Dasatinib in a clinical trial did not exert toxicity on normal cells [141] (NCT00953758).

More recently, two second generation autophagy inhibitors, Lys05 a highly potent lysosometric agent and PIK-III a selective inhibitor of VPS34, demonstrated synergistic effects with TKIs to reduce primary CML LSCs quiescence, compared to the first-generation autophagy inhibitor Hydroxychloroquine [33].

One can note that autophagy inhibition could have beneficial roles on other CML treatments. The plant phytoalexin Resveratrol was notably reported to induce autophagic cell death in primary CML-CD34<sup>+</sup> [57]. It was also reported by our group that the PRC1 component protein BMI1, that plays a key role in LSC self-renewal, prevented a protective CCNG2-dependent autophagy mechanism, that likely represents a means to support CML progression to the acute phase. Inhibition of BMI1 by the pharmacological drug PTC-209, synergized with Imatinib to strongly decrease the clonogenic properties of CD34<sup>+</sup> CML cells [92].

It is well known that limited oxygen availability in the microenvironment generates a gradient of oxygen from the blood vessel to hypoxic areas which regulates mTOR that in turn inhibits autophagy [142]. In this context, Ianniciello et al., blocked autophagy using the Vps34 inhibitor in both healthy and CML-CD34<sup>+</sup> and demonstrated that only healthy cells retained their capacity to proliferate after leaving hypoxia-induced quiescence, highlighting that autophagy is required for CD34<sup>+</sup> CML cells [143].

#### 3.2.5. Influence of the Microenvironment on CML Resistance

The microenvironment plays a major supportive role in hematological malignancies, during leukemogenesis, but also in the appearance of resistance and relapse. The medullary microenvironment represents a complex set of vascular, nerve, immune cells, that shape not only the structure and the plasticity of the BM but also its functions. In particular, interactions of HSCs with the BM niche are fundamental to both maintain the stem cell reservoir and to produce cells for all blood lineages after asymmetric division [144]. Similarly, preservation of quiescent CML-LSCs by the BMM is essential [145] and alterations in the microenvironmental regulation by leukemic cells can play a part in the modification of the CML-LSCs response to TKIs [146].

The therapeutic efficacy of interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) treatment was early explained by the normalization of the interactions between CML progenitors and their BMM [147] in part after restoration of a  $\beta$ 1 integrin-mediated inhibition of hematopoietic progenitor proliferation by BM [148]. IFN- $\alpha$  was then clinically tested in combination with Imatinib in a phase II clinical trial (NCT00045422).

The homing of BCR-ABL+ LSCs/progenitors to recipient marrow requires numerous physical interactions. CD44 expression was reported to be increased in BCR-ABL+ stem/progenitor cells, and by engaging functional E-selectin ligands, to improve homing and engraftment of leukemic cells [149]. Furthermore, destruction of selectin ligands by neuraminidase on leukemic progenitors reduced their engraftment [150].

Wnt/β-catenin signaling from the BMM was also shown to contribute to the preservation of CML-LSCs after TKI treatment [151]. Because secretion of Wnt ligands requires their modification by the O-acyl transferase Porcupine (PORCN), the effects of the selective PORCN inhibitor WNT974 were investigated. WNT974 efficiently blocked the Wnt pathway in primary human CML cells and in association with Nilotinib, strongly decreased the colony-forming potential of CML stem/progenitors [35]. The novel Wnt/β-catenin signaling inhibitor PRI-724, associated with Nilotinib synergistically killed TKI-resistant primary BC-CML cells even under leukemia/mesenchymal stromal cells (MSCs) co-culture conditions [36]. Besides, another mechanism of resistance of CML-LSCs to TKI treatment by MSCs was identified through N-cadherin receptors and Wnt-β-catenin signaling [152]. It was reported that a paracrine loop promoted self-renewal of LSCs, by stabilizing β-catenin, involving the overexpressed AXL tyrosine kinase receptor on primary CML CD34<sup>+</sup> cells and its ligand Gas6 secreted by MSCs [37]. In this context, pharmacological inhibition of AXL by the small molecules XL880 or R428, in combination with Nilotinib, strongly inhibited the growth of LSCs [37].

The bone morphogenetic protein (BMP) pathway represents another level of control of the BMM on LSCs with an over production of BMP2 and BMP4 that contributes to the dysregulation of intracellular BMP signaling in primary CP-CML samples [153]. In contrast to patients in complete cytogenetic remission, LSCs and progenitors from TKI-resistant patients displayed higher levels of BMPR1b expression and the mesenchymal cells of TKI-resistant patients increased BMP4 production, depicting

a BMP autocrine loop that could account for the resistance to TKI treatment [154]. These results suggest that new pharmacological molecules against the BMP pathway could target CML-LSCs in their niche.

The CXCR4/CXCL12 axis provides survival-enhancing traits to myeloid progenitor cells and was suspected of playing a similar function in CML [155]. A high level expression of CXCR4 and of CXCL12 was notably reported in CML cells and mesenchymal stromal cells respectively [34]. Moreover, Imatinib or Nilotinib treatments of BCR-ABL+ cells induced an increased surface expression of CXCR4 [38]. Disrupting the CXCR4/CXCL12 axis by the selective CXCR4 antagonists Plerifaxor (ADM3100) [34,38,156] or BTK140 [40] lead to increase of leukemic cells' sensitivity to TKIs. It was recently reported that CML-LSCs express the cytokine-targeting surface enzyme dipeptidylpeptidase-IV (DPPIV/CD26) that can disrupt SDF-1/CXCR4 interaction accounting for the extramedullary spread of CML-LSCs [157]. However, the specific CD26 inhibitor Vildagliptin in combination with Nilotinib did not reveal any significant cooperative effect on engraftment of CML cells in NSG mice [158].

Paracrine communication within the BMM is also crucial. For instance, BCR-ABL induced interleukin-6 (IL6) expression by BM stromal cells that in turn sustains CML development in engrafted mice [159]. This IL6 production can be the result of reprogrammed stromal cells in response to leukemic cells [160] and is suspected to decrease the self-renewal of normal progenitors. Welner et al. demonstrated that a specific IL6-blocking antibody of protected human CD34<sup>+</sup> cells when exposed to CML cells and that this approach might be an effective therapy in drug-resistant CML [161].

In line with this observation, Kuepper et al. reported that IL6 could be a trigger of a JAK1-STA3 signaling pathway activation leading to the persistence of CML-LSCs; in this context, the use of JAK1 specific inhibitors (Filgotinib and Itacitinib) in combination with BCR-ABL inhibition induced apoptosis in quiescent CML-LSCs [41]. Other recent studies performed on isolated BM-derived mesenchymal stem cells (MSCs) from CML patients, showed that interleukin-7 (IL7) is highly secreted by MSCs from Imatinib-resistant patients compared to responsive patients, and that IL7 elicited Imatinib and Nilotinib resistance via a BCR-ABL independent activation of JAK1/STAT5 signaling. This opens the way for treatments combining TKIs with IL7/JAK1/STAT5 inhibitors to manage CML [162]. In this context, direct or indirect inhibition of STAT5 has been a subject of great interest. The flavonoid-like chemical compound Wogonin potentiated the inhibitory effect of Imatinib on leukemia development by suppressing STAT5 pathway in primary CML CD34<sup>+</sup> cells [42]. Prost et al. used peroxysome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonists from the glitazone family and observed a marked disappearance of the CML-LSC pool after a decrease of STAT5 expression. Importantly, three patients receiving pioglitazone achieved sustained CMR, for up to 4.7 years [163]; NCT02767063). Two other phase II clinical trials have evaluated the efficiency of pioglitazone with Imatinib (NCT02687425, NCT02730195). Another study specified that pioglitazone could be combined with any of the first-, second- or third-generation TKIs to be effective against progenitor cells from both early and advanced stages CML [164].

The BMM presents a complex gradient of oxygen distribution, that differentially impacts both HSCs and LSCs [165]. LSCs are well adapted to this environment and can balance between self-renewal in low oxygen zones near the endosteal niche or engage in differentiation close to the vascular niches. The hypoxia-inducible transcription factor HIF1 $\alpha$  that triggers an adaptive response to low oxygen concentration is required for the maintenance and survival of CML-LSCs [166]. Furthermore, physiologic hypoxia promotes maintenance of CML-LSCs independently of BCR-ABL activity [167], suggesting that targeting HIF1 $\alpha$  in combination with a TKI could lead to complete eradication of LSCs.

3.2.6. Functional Cross-Talks between the Microenvironment and Immunotherapy in CML

CML development is associated with an alteration of immune responses [168] and a better knowledge in the immunological composition of the CML BMM led to the design of a novel risk stratification model predicting patient's response to TKI [169]. High-risk CML patients were shown to have an increased number of regulatory T cells (Treg) [170], and to highly express myeloid-derived suppressor cell (MDSC)-associated arginase 1 that can inhibit T-cell function [171]. Furthermore,

as CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> human CML cells express high levels of the CD25/IL2 receptor, inhibition of IL2 synthesis by cyclosporine in combination with Dasatinib was tested in a phase I clinical trial with the hope to eliminate CD25+ LSCs (NCT01426334).

On the other hand, CD34<sup>+</sup> LSCs from CML patients were shown to express programmed death receptor ligand 1 (PD-L1) at diagnosis [171] whose expression was further upregulated in response to IFN- $\gamma$  which could represent an interesting opportunity for T-cell immunotherapy of CML [172]. This is why some recent clinical trials are evaluating the benefit to block the PD-1/PD-L1 interaction by anti-PD-L1 antibodies on CML patients, either in combination with pioglitazone (Avelumab, NCT02767063) or Imatinib, Nilotinib or Dasatinib (Pembrolizumab, NCT03516279).

As for numerous cancer types, expression of MHC-II antigens was shown to be decreased on CML cells [58] which can participate in an immune evasion of CML cells. Tarafdar et al. have demonstrated that IFN- $\gamma$  treatment of CML stem/progenitor cells induced the re-expression of MHC-II antigens, that were down-regulated by JAK1/2-mediated signals from either CML cells and/or by the CML-modified microenvironment. This suggests that associating IFN- $\gamma$  with the JAK1/2 inhibitor Ruxolitinib (RUX) could favor potential immunomodulatory-based therapies [58].

Three clinical trials associating RUX and TKIs are currently in recruiting phase (NCT03654768, NCT01751425, NCT01914484) and one is terminated with encouraging results ([173], NCT01702064).

Before the use of TKIs, IFN- $\alpha$  treatment was the first-line therapy for CML, with some evidences of associated-immune activation particularly at the level of NK-cell cytotoxicity [174,175]. Burchert et al. found that IFN- $\alpha$  therapy was associated with an increased expression of leukemia-associated antigen proteinase-3 suggesting that the induction of proteinase-3-specific CTLs may contribute to sustained remission after Imatinib discontinuation [176].

Long time after being replaced by TKIs, IFN- $\alpha$  aroused renewed interest in CML therapy as witnessed by numerous clinical trials combining this cytokine with TKIs that show promising results [177,178]: Imatinib/IFN- $\alpha$  (NCT00045422; NCT00573378), Nilotinib/IFN- $\alpha$  (NCT01657604; NCT00573378), Dasatinib/IFN- $\alpha$  NCT01725204) and Bosutinib/IFN- $\alpha$  (NCT03831776).

#### 3.2.7. Tumor Microenvironment Impacts CML Cell's Metabolism

LSCs from hematologic disorders establish narrow links with their stroma as a way to regulate their metabolism and redox state which are both crucial for leukemogenesis as described previously [179]. CML cells in their stromal microenvironment express specific metabolic features that represent opportunities for new treatment approaches, some of which are already being tested in clinical trials.

Earlier, it was reported that CML patients either sensitive or resistant to Imatinib showed heterogenous metabolic responses compared to their normal counterparts [180]. More recently, using liquid chromatography spectrometric metabolite profiling coupled with a multivariate statistical method, Karlikova et al. identified modifications of the metabolome of CML patients treated with TKIs, highlighting major changes in glycolysis, the citric acid cycle and amino acid metabolism [181]. Furthermore, they observed differences in the levels of amino acids and acylcarnitines between Imatinib-responder and non-responder CML patients [181]. Hattori et al. reported, in human and mouse CML models, that progression of the disease depended on a highly activated and functional expression of BCAT1, a cytosolic aminotransferase for branched-chain amino acids (BCAAs) [182]. Interestingly, eradication of LSCs has been demonstrated after targeting the amino acid metabolism in AML [183] but this LSC metabolic vulnerability has yet to be demonstrated in CML.

Besides AA metabolism, glycolysis, citric acid cycle and oxidative phosphorylation constitute numerous alternative therapies for CML. Indeed, it was shown that primary CD34<sup>+</sup> CML cells depend on upregulated metabolism for their survival as demonstrated by stable isotope-assisted metabolomics and functional assays, and that the combination of Imatinib with the antibiotic tigecycline, that inhibits mitochondrial protein translation, selectively eliminates CML-LSCs [43]. SIRT1, as mentioned earlier, contributes to CML-LSCs maintenance and TKI resistance. Abraham et al. explained, by using the PGC-1 $\alpha$  inhibitor SR18292, that the transcriptional coactivator and SIRT1-substrate, PGC-1 $\alpha$  mediated

these biological aspects by increasing oxidative phosphorylation [14]. In the same study, SR18292 strongly reduced oxygen consumption rate (OCR) on CML CD34<sup>+</sup> without affecting extracellular acidification rate (ECAR) and combination with Nilotinib highly increased apoptosis and reduced clonogenicity of the leukemic cells [14].

Autophagy can also be connected to metabolism in CML cells. Another antibiotic, Ivermectin, well known for inducing autophagy by interfering with the Akt/mTOR pathway in other cancers [184], was found to induce caspase-dependent apoptosis of CML cells following induction of mitochondrial dysfunction and oxidative stress by respiratory complex I inhibition. This molecule, in combination either with Imatinib or Dasatinib, increased primary CML CD34<sup>+</sup> cell death [44]. In addition, Karvela et al. demonstrated that pharmacological inhibition of autophagy or downregulation of ATG7, induced a decrease in glycolysis, an increase in oxidative phosphorylation and mitochondrial ROS accumulation thus highlighting ATG7 as a potent therapeutic target in CML [59].

Besides the BMM, Ye et al. reported that a subpopulation of LSCs expressing CD36 fatty acid transporter can use gonadal adipose tissue (GAT) as an extra-medullary niche to fuel their metabolism and evade chemotherapy [185].

Interestingly, BCL2 inhibition was demonstrated to reduce oxidative phosphorylation and selectively eradicate in AML-LSCs [186]. The previously described efficacy of BCL2 inhibition [25] in CML could be partially explained by this mechanism.

#### 3.2.8. Targeting Signaling Pathways Connected to Key Leukemic Stem Cells Features

Self-renewal of LSCs is regulated by multiple pathways such as the Wnt, Shh, BMI1 pathways and is highly dependent on the tumor microenvironment as previously described. Blocking this fundamental stem cell function through inhibition of these pathways is an obvious strategy. There has been an accumulation of studies showing a strong role of Wnt/β-catenin in blastic transformation [187], in survival of BCR-ABL leukemic cells [188] and in self-renewal of CML-LSCs [189]. Interestingly, CML-LSCs were shown to express CD27 that responds to the tumor necrosis factor (TNF) family ligand CD70 to increase expression of Wnt target genes [190]. Furthermore, because expression of CD70 is restricted to activated lymphocytes and dendritic cells its engagement could account for an adaptive immune response to leukemia progression [190]. More recently, Riether et al. demonstrated that TKIs induced the expression of CD70 in LSCs triggering CD27 signaling in a cell-autonomous and/or paracrine manner. The blockade of CD70 by a specific antibody combined with Imatinib effectively eliminated human CD34<sup>+</sup> CML progenitor/stem cells [45]. Despite all these possibilities, the only pharmacological approach tested on primary CML CD34<sup>+</sup> cells are the selective PORCN inhibitor, WNT974 described above [35].

Smoothened (Smo), a component of the Hedgehog (Shh) pathway involved in LSCs self-renewal, was considered as a promising target to eliminate LSCs despite its important role in the maintenance of normal HSCs [191]. Indeed, two different studies demonstrated that targeting the Shh pathway may provide some benefits. It was first observed that overexpression of miR-326 downregulated Smo to induce an elevated rate of apoptosis in CML CD34<sup>+</sup> cells [60]. In addition, inhibition of Shh by the Smo antagonist LDE225 (Sonidegib) in combination with Imatinib, reduced the self-renewal capacity of CD34<sup>+</sup> CP-CML and their engraftment in NSG mice, without affecting HSCs [46]. Sonidegib was also combined with Nilotinib in the treatment of chronic or accelerated phase in patients who developed resistance to first-line therapy (NCT01456676). Besides, the specific targeting of Smo has been evaluated in clinical trials in combination with Dasatinib (BMS-833923; NCT01218477 and NCT01357655) (PF04449913; NCT00953758).

BCR-ABL controls many signaling pathways some of which are essential for resistance to TKI-induced apoptosis: PI3K/AKT [192], JAK/STAT [193,194], or Ras/MEK/ERK [195] and represent therefore good secondary targetable candidates to reach a cure for CML [196].

AKT can inhibit FOXO-mediated transcription of genes required for apoptosis such as Bim [197]. More precisely, Naka et al. describe that FOXO3a plays an essential role in the maintenance of CML-LSCs in a CML-like myeloproliferative disease mouse model [47] and that TGF- $\beta$  activates AKT in LSCs by controlling FOXO3a localization [47]. Furthermore, the association of the TGF- $\beta$  inhibitors, Ly364947 with Imatinib [47] or EW-7197 with Imatinib, Dasatinib or Ponatinib [11] was efficient to respectively decrease the maintenance of LSCs and to eliminate CML leukemia-initiating cells.

As discussed above in the autophagy section, the clinically well tolerated mTOR inhibitor RAD001 was used to block Imatinib-induced AKT activation that mediates survival during the early phase of Imatinib resistance [198].

Janus kinase 2 (JAK2) has recently emerged as an attractive target to improve TKI treatment in CML as demonstrated *in-vitro* [199]. Moreover, the JAK2 inhibitor BMS-911543 selectively targets CML-LSCs without affecting healthy progenitor/stem cells and its association with Dasatinib effectively eliminated primary TKI-insensitive CML-LSCs [48]. The other JAK2 inhibitor RUX was successfully combined with Nilotinib to lead to a strong reduction in primitive quiescent CML stem cells [50].

The Ras/MEK/ERK pathway can be targeted at different levels and many molecules have been tested in combination with TKIs. Farnesyl transferase inhibitors such as BMS-214662 (that inactivate Ras by inhibiting its recruitment to the plasma membrane) have been associated with Imatinib in a phase I clinical trial (Zarnestra; NCT00040105 and Lonafarnib; NCT00047502). MEK could also be a potential therapeutic target, as its specific MEK inhibitor PD184352, when combined with BMS-214662 increased apoptosis in TKI-unresponsive CD34<sup>+</sup> CML cells [61]. Lonafernib that inhibits Raf was evaluated in a phase I clinical trial (NCT00047502). Imatinib was also tested with the dual Raf/VEGFR inhibitor Sorafenib in a phase II clinical trial (NCT00661180) and with the VEGFR inhibitor Vatalanib in a phase I/II study (NCT00088231). Grb2 is a potent activator of ERK1 and ERK2 in Ph+ leukemic cells [200], and the use of BP1001, a liposome-packaged Grb2 antisense oligonucleotide is well tolerated in CML patients [201] and is evaluated in combination with Dasatinib in a phase I/II clinical trial (NCT02923986).

Niclosamide, an FDA-approved anthelmintic drug, inhibits the overexpressed ERK/MNK1/eIF4E pathway which makes BP-CML more sensitive to Dasatinib [49]. The MNK inhibitor CGP57380 was as efficient as Dasatinib to impair LSCs function [62]. Activation of  $\beta$ -catenin was linked to CML drug resistance through BCR-ABL impaired binding to GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ). The specific GSK3 inhibitor SB216763, associated with Imatinib led to an almost complete suppression of primary CML progenitors/stem cells but failed to do so when combined with Dasatinib [202].

The dysregulation of the serine/threonine Aurora kinases (A, B and C) activity is well known to induce chromosome instability and aberrant mitosis in hematologic malignancies [203]. Targeting this pathway in CML, and particularly in TKI-resistant patients, emerged quite early. In this line, the pan-Aurora Kinase inhibitor MK-0457 (VX-680), has been investigated for the treatment of resistant CML patients harboring the BCR-ABL mutation T315I with encouraging results at a dose that did not induce side effects [204] while 44% of the patients had hematological responses [205], and cytogenetic responses were observed in 14% of patients in a phase II study ([206]; NCT00111683). A phase I study also evaluated the combination of Dasatinib and MK-0457 on CML patients (NCT00500006).

On the other hand, the arachidonic acid (AA)-leukotriene (LT) pathway has been demonstrated to be implicated in the LSCs survival. *Alox15*, that encodes for the 15-lipoxygenase (15-LO), has been shown to play an essential role in the functional regulation of CML-LSCs and specific inhibition of 15-LO by PD146176 leads to human CML CD34<sup>+</sup> death with a synergy when combined either with imatinib or nilotinib [51]. Among the products of 15-LO, LTB4 can stimulate BLT2 receptor whose expression is significantly increased in CML CD34<sup>+</sup> stem/progenitors, and inhibition of this pathway by the BLT2-specific inhibitor LY255283 induced apoptosis and inhibited self-renewal capacity of CD34<sup>+</sup> cells from TKI-resistant BP-CML patients [63].

#### 4. Conclusions

CML has benefited from three generations of TKIs, which have transformed the leukemia into a perfectly controlled disease but for which interruption of the monotherapy is often associated with relapse due to persisting LSCs.

Numerous studies have identified molecular and functional dysregulations in LSCs as well as specific relationships between CML cells and their medullary tissue environment, which can also be involved in the emergence of TKI resistance. The development of molecules targeting these different situations has frequently demonstrated that it was possible to improve the sensitivity of LSCs to TKIs supporting the development of combinatorial treatments. Association of TKI with other drugs recently emerged as stronger solutions to eliminate LSCs that in some cases are being investigated in clinical trials.

Thus, in the past two decades, studies have first shown that it may be interesting to target epigenetic and apoptotic functions. Numerous ex-vivo studies have also described the autophagic survival process as a potential target leading to LSCs eradication that should soon be tested in clinical trials. The most recent insights concern metabolic differences between LSCs and HSCs, like mitochondrial bioenergetics and indirect or direct targeting of the mitochondrial respiratory chain have already been tested on primary CML cells and need to be evaluated in clinical investigations.

Other new strategies aimed at targeting the tumor microenvironment, mostly inspired from ex-vivo experiments, have already made their way to clinical trials. The emerging success of immunotherapies targeting immune checkpoints in other cancers will probably be an additional option to improve the efficacy of TKIs in CML.

Recent technological advances are allowing new studies deciphering the heterogeneity between cancer cells and the establishment of predictive models for TKIs response. Current developments in single-cell transcriptomic analysis identified a blast-crisis specific stem cell population resistant to a TKI treatment [207].

NGS is now the gold standard method to detect early occurrences of kinase domain mutations, that helps to predict relapses [208,209].

In parallel, Single Cell Analysis is a promising emerging approach to identify genome-scale molecular information at the single cell level. By combining transcriptomic and proteomic analyses, Abraham et al. showed, at the CML patient level the therapeutic potential of RG7112/7388 (HDM2 inhibitors) and CPI-203/0610 (BET inhibitors) combination to target p53 and c-MYC respectively in LSC maintenance [64].

With up-to-date technologies, the fundamental knowledge about the mechanisms which govern LSCs response to TKIs according to individuals will improve. We can then expect in the near future that multi-drug regimens, developed around TKIs, can be proposed to tackle the different molecular or cellular pathways associated with TKI resistance that have been described here, aiming ultimately at the development of personalized treatments.

**Funding:** This work was supported in part by FiLMC-Pfizer grant and by INSERM. Fabien Muselli has been supported by a grant from the French Ministry of Research through Université Côte d'Azur and a 4<sup>th</sup> year PhD grant from the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

#### Abbreviations

15-LO	15-Lipoxygenase
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
A-loop	Activation-loop
AA	Arachidonic acid
ABC	ATP-binding cassette
ABCB1/MCR1	Multidrug resistance protein 1/Permeability glycoprotein
ABCC1/MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1

ABCG2/BCRP	ATP-binding cassette super-family G member 2
AKT/PKB	Protein kinase B
AML	Acute Myeloid Leukemia
AMP	Adenosine Monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP	Adenomatous Polyposis Coli
Ara-C	Cytarabine
ATG	Autophagy related genes
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
AXL	Tyrosine-protein kinase receptor UFO
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL6	B-cell lymphoma 6
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BCR-ABI	Breakpoint Cluster Region-Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
BET	Bromodomain Extra-Terminal motif
BH3	Bd-2 homology domain 3
BIM	Bel 2 like protoin 11
	Loukotrione PA recentor 2
DL12	Leukotriene 64 receptor 2
BM DMI1	Bone Marrow
BMII	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1
BMM	Bone marrow microenvironment
BMP	Bone morphogenetic proteins
BP-CML	Blastic phase chronic myeloid leukemia
c-ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
C/EBPβ	CCAAT/Enhancer-binding Protein beta
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma
CCNG2	Cyclin G2
CCR	Complete Cytogenetic Remission
CHR	Complete Hematological Remission
CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator 2
CpN	Cyclophilin
CML	Chronic Myeloid Leukemia
CQ	Chloroquine
CRK	CT10 Regulator of Kinase
CRKL	Crk-like protein
CsA	Cyclosporine
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
Cyt	Cytokines
CvtR	Cytokine receptors
DNA	Deoxyribonucleic acid
DVL	Dishevelled
ECAR	Extracellular Acidification Rate
EIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FTC	Electron Transport Chain
F7H2	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
FOXO	Forkhead box protein O
CAB2	CRB2-associated-binding protein 2
CAS6	Growth arrest_specific 6
CL II	Clioma associated ancogana homologua 1
CPR2	Growth factor recentor bound protoin ?
GKDZ	Chargen Symthese Vinese 2 Pote
G3K-3þ	Glycogen Synthase Ninase 5 deta
пзк2/тез	Flistone FL3 trimethylase activity at lysine 2/

HCQ	Hydroxychloroquine
HIF-2α	Hypoxia-inducible factor-2 alpha
HDAC	Histone deacetylase
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILR	Interleukin Receptor
JAK	Janus-family tyrosine kinase
LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3
LIC	Leukemia-Initiating Cells
LRP5/6	Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6
LSC	Leukemic Stem Cell
LT	Leukotriene
LTB4	Leukotriene B4
MCL-1	induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MCR	Major Cytogenetic Remission
MDR	Multidrug Resistance
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MHC	Maior histocompability complex
miRNA	Miajor ribo pucleic acid:
MNIK	MAP kinasa interacting saring/threaning protain kinasa
MPT	Mitachondrial protain translation
mTOP	machanistic Target Of Panamucin
NEAT	Nuclear factor of activited T colle
NFAI	Nuclear factor of activated 1-cens
	Nonodese diadetic/severe combined immunodencient
(NUD/SCID)	O
OCK	Oxygen Consumption Rate
P-loop	Phosphate-binding loop
PAKI	Serine/threonine-protein kinase 1
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K-III	Phosphoinositide 3-kinase class III
PORCN	Porcupine O-acyltransferase
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRC	Protein regulator of cytokinesis
PTCH	Protein patched homolog 1
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma kinases
RPS6	Ribosomal protein S6
SH2/SH3	SRC Homology 2/3 Domain
SHC	SH2-contaltining collagen-related proteins
SHH	Sonic Hedgehog
SIRT1	Sirtuin 1
SMO	Smoothened
SOS	Son Of Sevenless guanine nucleotide exchange factor
STAT	Signal transducer and activator of transcription;
TCR	T cell receptor
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
TGF-βR	abrogated transforming growth factor beta receptor
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor
TNF	Tumor Necrosis Factor
Ub	Ubiquitin
ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase 1

VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WNT	Wingless-related integration site

#### References

- 1. Cilloni, D.; Saglio, G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 930–937. [CrossRef] [PubMed]
- 2. Stone, R.M. Optimizing treatment of chronic myeloid leukemia: A rational approach. *Oncologist* **2004**, *9*, 259–270. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Druker, B.J.; Talpaz, M.; Resta, D.J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford, J.M.; Lydon, N.B.; Kantarjian, H.; Capdeville, R.; Ohno-Jones, S.; et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1031–1037. [CrossRef] [PubMed]
- 4. Kaleem, B.; Shahab, S.; Ahmed, N.; Shamsi, T.S. Chronic Myeloid Leukemia–Prognostic Value of Mutations. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2015, *16*, 7415–7423. [CrossRef]
- Caldemeyer, L.; Dugan, M.; Edwards, J.; Akard, L. Long-Term Side Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2016, 11, 71–79. [CrossRef]
- Mahon, F.X.; Rea, D.; Guilhot, J.; Guilhot, F.; Huguet, F.; Nicolini, F.; Legros, L.; Charbonnier, A.; Guerci, A.; Varet, B.; et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: The prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010, *11*, 1029–1035. [CrossRef]
- Eide, C.A.; Zabriskie, M.S.; Savage Stevens, S.L.; Antelope, O.; Vellore, N.A.; Than, H.; Schultz, A.R.; Clair, P.; Bowler, A.D.; Pomicter, A.D.; et al. Combining the Allosteric Inhibitor Asciminib with Ponatinib Suppresses Emergence of and Restores Efficacy against Highly Resistant BCR-ABL1 Mutants. *Cancer Cell* 2019, *36*, 431–443 e435. [CrossRef]
- Scott, M.T.; Korfi, K.; Saffrey, P.; Hopcroft, L.E.; Kinstrie, R.; Pellicano, F.; Guenther, C.; Gallipoli, P.; Cruz, M.; Dunn, K.; et al. Epigenetic Reprogramming Sensitizes CML Stem Cells to Combined EZH2 and Tyrosine Kinase Inhibition. *Cancer Discov.* 2016, *6*, 1248–1257. [CrossRef]
- Bellodi, C.; Lidonnici, M.R.; Hamilton, A.; Helgason, G.V.; Soliera, A.R.; Ronchetti, M.; Galavotti, S.; Young, K.W.; Selmi, T.; Yacobi, R.; et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J. Clin. Investig.* 2009, *119*, 1109–1123. [CrossRef]
- Fiskus, W.; Pranpat, M.; Balasis, M.; Bali, P.; Estrella, V.; Kumaraswamy, S.; Rao, R.; Rocha, K.; Herger, B.; Lee, F.; et al. Cotreatment with vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) enhances activity of dasatinib (BMS-354825) against imatinib mesylate-sensitive or imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Clin. Cancer Res.* 2006, *12*, 5869–5878. [CrossRef]
- 11. Naka, K.; Ishihara, K.; Jomen, Y.; Jin, C.H.; Kim, D.H.; Gu, Y.K.; Jeong, E.S.; Li, S.; Krause, D.S.; Kim, D.W.; et al. Novel oral transforming growth factor-beta signaling inhibitor EW-7197 eradicates CML-initiating cells. *Cancer Sci.* **2016**, *107*, 140–148. [CrossRef] [PubMed]
- Cervera, E.; Candelaria, M.; Lopez-Navarro, O.; Labardini, J.; Gonzalez-Fierro, A.; Taja-Chayeb, L.; Cortes, J.; Gordillo-Bastidas, D.; Duenas-Gonzalez, A. Epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate reverses imatinib resistance in patients with chronic myeloid leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012, 12, 207–212. [CrossRef] [PubMed]
- 13. Li, L.; Wang, L.; Li, L.; Wang, Z.; Ho, Y.; McDonald, T.; Holyoake, T.L.; Chen, W.; Bhatia, R. Activation of p53 by SIRT1 inhibition enhances elimination of CML leukemia stem cells in combination with imatinib. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 266–281. [CrossRef] [PubMed]
- Abraham, A.; Qiu, S.; Chacko, B.K.; Li, H.; Paterson, A.; He, J.; Agarwal, P.; Shah, M.; Welner, R.; Darley-Usmar, V.M.; et al. SIRT1 regulates metabolism and leukemogenic potential in CML stem cells. *J. Clin. Investig.* 2019, 130, 2685–2701. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Yu, Y.; Yang, L.; Zhao, M.; Zhu, S.; Kang, R.; Vernon, P.; Tang, D.; Cao, L. Targeting microRNA-30a-mediated autophagy enhances imatinib activity against human chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* **2012**, *26*, 1752–1760. [CrossRef] [PubMed]

- 16. Deng, Y.; Li, X.; Feng, J.; Zhang, X. Overexpression of miR-202 resensitizes imatinib resistant chronic myeloid leukemia cells through targetting Hexokinase 2. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*. [CrossRef] [PubMed]
- Wang, L.S.; Li, L.; Li, L.; Chu, S.; Shiang, K.D.; Li, M.; Sun, H.Y.; Xu, J.; Xiao, F.J.; Sun, G.; et al. MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and enhances growth and modulates drug response in CML progenitors. *Blood* 2015, 125, 1302–1313. [CrossRef]
- Tu, Y.X.; Wang, S.B.; Fu, L.Q.; Li, S.S.; Guo, Q.P.; Wu, Y.; Mou, X.Z.; Tong, X.M. Ovatodiolide targets chronic myeloid leukemia stem cells by epigenetically upregulating hsa-miR-155, suppressing the BCR-ABL fusion gene and dysregulating the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Oncotarget* 2018, *9*, 3267–3277. [CrossRef]
- Hurtz, C.; Hatzi, K.; Cerchietti, L.; Braig, M.; Park, E.; Kim, Y.M.; Herzog, S.; Ramezani-Rad, P.; Jumaa, H.; Muller, M.C.; et al. BCL6-mediated repression of p53 is critical for leukemia stem cell survival in chronic myeloid leukemia. *J. Exp. Med.* 2011, 208, 2163–2174. [CrossRef]
- 20. Madapura, H.S.; Nagy, N.; Ujvari, D.; Kallas, T.; Krohnke, M.C.L.; Amu, S.; Bjorkholm, M.; Stenke, L.; Mandal, P.K.; McMurray, J.S.; et al. Interferon gamma is a STAT1-dependent direct inducer of BCL6 expression in imatinib-treated chronic myeloid leukemia cells. *Oncogene* **2017**, *36*, 4619–4628. [CrossRef]
- 21. Goff, D.J.; Court Recart, A.; Sadarangani, A.; Chun, H.J.; Barrett, C.L.; Krajewska, M.; Leu, H.; Low-Marchelli, J.; Ma, W.; Shih, A.Y.; et al. A Pan-BCL2 inhibitor renders bone-marrow-resident human leukemia stem cells sensitive to tyrosine kinase inhibition. *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 316–328. [CrossRef] [PubMed]
- 22. Mak, D.H.; Wang, R.Y.; Schober, W.D.; Konopleva, M.; Cortes, J.; Kantarjian, H.; Andreeff, M.; Carter, B.Z. Activation of apoptosis signaling eliminates CD34<sup>+</sup> progenitor cells in blast crisis CML independent of response to tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia* **2012**, *26*, 788–794. [CrossRef] [PubMed]
- Airiau, K.; Mahon, F.X.; Josselin, M.; Jeanneteau, M.; Turcq, B.; Belloc, F. ABT-737 increases tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells through XIAP downregulation and sensitizes CD34<sup>+</sup> CD38(-) population to imatinib. *Exp. Hematol.* 2012, 40, 367–378.e362. [CrossRef] [PubMed]
- 24. Carter, B.Z.; Mak, P.Y.; Mak, D.H.; Ruvolo, V.R.; Schober, W.; McQueen, T.; Cortes, J.; Kantarjian, H.M.; Champlin, R.E.; Konopleva, M.; et al. Synergistic effects of p53 activation via MDM2 inhibition in combination with inhibition of Bcl-2 or Bcr-Abl in CD34<sup>+</sup> proliferating and quiescent chronic myeloid leukemia blast crisis cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 30487–30499. [CrossRef] [PubMed]
- 25. Carter, B.Z.; Mak, P.Y.; Mu, H.; Wang, X.; Tao, W.; Mak, D.H.; Dettman, E.J.; Cardone, M.; Zernovak, O.; Seki, T.; et al. Combined inhibition of MDM2 and Bcr-Abl tyrosine kinase targets chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells in a murine model. *Haematologica* **2019**. [CrossRef] [PubMed]
- Ko, T.K.; Chuah, C.T.; Huang, J.W.; Ng, K.P.; Ong, S.T. The BCL2 inhibitor ABT-199 significantly enhances imatinib-induced cell death in chronic myeloid leukemia progenitors. *Oncotarget* 2014, *5*, 9033–9038. [CrossRef] [PubMed]
- 27. Carter, B.Z.; Mak, P.Y.; Mu, H.; Zhou, H.; Mak, D.H.; Schober, W.; Leverson, J.D.; Zhang, B.; Bhatia, R.; Huang, X.; et al. Combined targeting of BCL-2 and BCR-ABL tyrosine kinase eradicates chronic myeloid leukemia stem cells. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 355ra117. [CrossRef]
- 28. Calabretta, B.; Salomoni, P. Inhibition of autophagy: A new strategy to enhance sensitivity of chronic myeloid leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk. Lymphoma* **2011**, *52*, 54–59. [CrossRef]
- 29. Pena, M.C.R.; Pardini, M.I.M.C.; Colturato, V.A.R.; Pinheiro, N.A. Methylation status of the SOCS 1 and JUNB genes in chronic myeloid leukemia patients. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2009**, *31*, 147–152. [CrossRef]
- 30. Carella, A.M.; Beltrami, G.; Catania, G.; Pica, G.; Ghiggi, C.; Garuti, A.; Carella, A. Inhibition of autophagy with clarithromycin: A new strategy to enhance sensitivity of CML stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk. Suppl.* **2012**, *1*, S49–S50. [CrossRef]
- 31. Shao, S.; Li, S.; Qin, Y.; Wang, X.; Yang, Y.; Bai, H.; Zhou, L.; Zhao, C.; Wang, C. Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia. *Int. J. Oncol.* **2014**, *44*, 1661–1668. [CrossRef] [PubMed]
- 32. Katagiri, S.; Tauchi, T.; Okabe, S.; Minami, Y.; Kimura, S.; Maekawa, T.; Naoe, T.; Ohyashiki, K. Combination of ponatinib with Hedgehog antagonist vismodegib for therapy-resistant BCR-ABL1-positive leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 1422–1432. [CrossRef] [PubMed]
- Baquero, P.; Dawson, A.; Mukhopadhyay, A.; Kuntz, E.M.; Mitchell, R.; Olivares, O.; Ianniciello, A.; Scott, M.T.; Dunn, K.; Nicastri, M.C.; et al. Targeting quiescent leukemic stem cells using second generation autophagy inhibitors. *Leukemia* 2019, 33, 981–994. [CrossRef] [PubMed]
- 34. Vianello, F.; Villanova, F.; Tisato, V.; Lymperi, S.; Ho, K.K.; Gomes, A.R.; Marin, D.; Bonnet, D.; Apperley, J.; Lam, E.W.; et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica* 2010, *95*, 1081–1089. [CrossRef]
- 35. Agarwal, P.; Zhang, B.; Ho, Y.; Cook, A.; Li, L.; Mikhail, F.M.; Wang, Y.; McLaughlin, M.E.; Bhatia, R. Enhanced targeting of CML stem and progenitor cells by inhibition of porcupine acyltransferase in combination with TKI. *Blood* **2017**, *129*, 1008–1020. [CrossRef]
- 36. Zhou, H.; Mak, P.Y.; Mu, H.; Mak, D.H.; Zeng, Z.; Cortes, J.; Liu, Q.; Andreeff, M.; Carter, B.Z. Combined inhibition of beta-catenin and Bcr-Abl synergistically targets tyrosine kinase inhibitor-resistant blast crisis chronic myeloid leukemia blasts and progenitors in vitro and in vivo. *Leukemia* 2017, *31*, 2065–2074. [CrossRef]
- 37. Jin, Y.; Nie, D.; Li, J.; Du, X.; Lu, Y.; Li, Y.; Liu, C.; Zhou, J.; Pan, J. Gas6/AXL Signaling Regulates Self-Renewal of Chronic Myelogenous Leukemia Stem Cells by Stabilizing beta-Catenin. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 2842–2855. [CrossRef]
- Dillmann, F.; Veldwijk, M.R.; Laufs, S.; Sperandio, M.; Calandra, G.; Wenz, F.; Zeller, J.; Fruehauf, S. Plerixafor inhibits chemotaxis toward SDF-1 and CXCR4-mediated stroma contact in a dose-dependent manner resulting in increased susceptibility of BCR-ABL+ cell to Imatinib and Nilotinib. *Leuk. Lymphoma* 2009, 50, 1676–1686. [CrossRef]
- 39. Helgason, G.V.; Karvela, M.; Holyoake, T.L. Kill one bird with two stones: Potential efficacy of BCR-ABL and autophagy inhibition in CML. *Blood* **2011**, *118*, 2035–2043. [CrossRef]
- 40. Beider, K.; Darash-Yahana, M.; Blaier, O.; Koren-Michowitz, M.; Abraham, M.; Wald, H.; Wald, O.; Galun, E.; Eizenberg, O.; Peled, A.; et al. Combination of imatinib with CXCR4 antagonist BKT140 overcomes the protective effect of stroma and targets CML in vitro and in vivo. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 1155–1169. [CrossRef]
- 41. Kuepper, M.K.; Butow, M.; Herrmann, O.; Ziemons, J.; Chatain, N.; Maurer, A.; Kirschner, M.; Maie, T.; Costa, I.G.; Eschweiler, J.; et al. Stem cell persistence in CML is mediated by extrinsically activated JAK1-STAT3 signaling. *Leukemia* **2019**, *33*, 1964–1977. [CrossRef] [PubMed]
- 42. Xu, X.; Zhang, X.; Liu, Y.; Yang, L.; Huang, S.; Lu, L.; Wang, S.; Guo, Q.; Zhao, L. BM microenvironmental protection of CML cells from imatinib through Stat5/NF-kappaB signaling and reversal by Wogonin. *Oncotarget* **2016**, *7*, 24436–24454. [CrossRef] [PubMed]
- 43. Kuntz, E.M.; Baquero, P.; Michie, A.M.; Dunn, K.; Tardito, S.; Holyoake, T.L.; Helgason, G.V.; Gottlieb, E. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1234–1240. [CrossRef] [PubMed]
- Wang, J.; Xu, Y.; Wan, H.; Hu, J. Antibiotic ivermectin selectively induces apoptosis in chronic myeloid leukemia through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018, 497, 241–247. [CrossRef]
- 45. Riether, C.; Schurch, C.M.; Flury, C.; Hinterbrandner, M.; Druck, L.; Huguenin, A.L.; Baerlocher, G.M.; Radpour, R.; Ochsenbein, A.F. Tyrosine kinase inhibitor-induced CD70 expression mediates drug resistance in leukemia stem cells by activating Wnt signaling. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 298ra119. [CrossRef]
- 46. Irvine, D.A.; Zhang, B.; Kinstrie, R.; Tarafdar, A.; Morrison, H.; Campbell, V.L.; Moka, H.A.; Ho, Y.; Nixon, C.; Manley, P.W.; et al. Deregulated hedgehog pathway signaling is inhibited by the smoothened antagonist LDE225 (Sonidegib) in chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25476. [CrossRef]
- 47. Naka, K.; Hoshii, T.; Muraguchi, T.; Tadokoro, Y.; Ooshio, T.; Kondo, Y.; Nakao, S.; Motoyama, N.; Hirao, A. TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* **2010**, 463, 676–680. [CrossRef]
- Lin, H.; Chen, M.; Rothe, K.; Lorenzi, M.V.; Woolfson, A.; Jiang, X. Selective JAK2/ABL dual inhibition therapy effectively eliminates TKI-insensitive CML stem/progenitor cells. *Oncotarget* 2014, *5*, 8637–8650. [CrossRef]
- 49. Liu, Z.; Li, Y.; Lv, C.; Wang, L.; Song, H. Anthelmintic drug niclosamide enhances the sensitivity of chronic myeloid leukemia cells to dasatinib through inhibiting Erk/Mnk1/eIF4E pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *478*, 893–899. [CrossRef]
- 50. Gallipoli, P.; Cook, A.; Rhodes, S.; Hopcroft, L.; Wheadon, H.; Whetton, A.D.; Jorgensen, H.G.; Bhatia, R.; Holyoake, T.L. JAK2/STAT5 inhibition by nilotinib with ruxolitinib contributes to the elimination of CML CD34+ cells in vitro and in vivo. *Blood* **2014**, *124*, 1492–1501. [CrossRef]

- Chen, Y.; Peng, C.; Abraham, S.A.; Shan, Y.; Guo, Z.; Desouza, N.; Cheloni, G.; Li, D.; Holyoake, T.L.; Li, S. Arachidonate 15-lipoxygenase is required for chronic myeloid leukemia stem cell survival. *J. Clin. Investig.* 2014, 124, 3847–3862. [CrossRef] [PubMed]
- Xie, H.; Peng, C.; Huang, J.; Li, B.E.; Kim, W.; Smith, E.C.; Fujiwara, Y.; Qi, J.; Cheloni, G.; Das, P.P.; et al. Chronic Myelogenous Leukemia- Initiating Cells Require Polycomb Group Protein EZH2. *Cancer Discov.* 2016, 6, 1237–1247. [CrossRef] [PubMed]
- Rauzan, M.; Chuah, C.T.; Ko, T.K.; Ong, S.T. The HDAC inhibitor SB939 overcomes resistance to BCR-ABL kinase Inhibitors conferred by the BIM deletion polymorphism in chronic myeloid leukemia. *PLoS ONE* 2017, 12, e0174107. [CrossRef] [PubMed]
- 54. Jin, Y.; Zhou, J.; Xu, F.; Jin, B.; Cui, L.; Wang, Y.; Du, X.; Li, J.; Li, P.; Ren, R.; et al. Targeting methyltransferase PRMT5 eliminates leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 3961–3980. [CrossRef]
- 55. Mitchell, R.; Hopcroft, L.E.M.; Baquero, P.; Allan, E.K.; Hewit, K.; James, D.; Hamilton, G.; Mukhopadhyay, A.; O'Prey, J.; Hair, A.; et al. Targeting BCR-ABL-Independent TKI Resistance in Chronic Myeloid Leukemia by mTOR and Autophagy Inhibition. *J. Natl. Cancer Inst.* **2018**, *110*, 467–478. [CrossRef]
- 56. Zeng, X.; Zhao, H.; Li, Y.; Fan, J.; Sun, Y.; Wang, S.; Wang, Z.; Song, P.; Ju, D. Targeting Hedgehog signaling pathway and autophagy overcomes drug resistance of BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia. *Autophagy* **2015**, *11*, 355–372. [CrossRef]
- 57. Puissant, A.; Robert, G.; Fenouille, N.; Luciano, F.; Cassuto, J.P.; Raynaud, S.; Auberger, P. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1042–1052. [CrossRef]
- Tarafdar, A.; Hopcroft, L.E.; Gallipoli, P.; Pellicano, F.; Cassels, J.; Hair, A.; Korfi, K.; Jorgensen, H.G.; Vetrie, D.; Holyoake, T.L.; et al. CML cells actively evade host immune surveillance through cytokine-mediated downregulation of MHC-II expression. *Blood* 2017, *129*, 199–208. [CrossRef]
- 59. Karvela, M.; Baquero, P.; Kuntz, E.M.; Mukhopadhyay, A.; Mitchell, R.; Allan, E.K.; Chan, E.; Kranc, K.R.; Calabretta, B.; Salomoni, P.; et al. ATG7 regulates energy metabolism, differentiation and survival of Philadelphia-chromosome-positive cells. *Autophagy* **2016**, *12*, 936–948. [CrossRef]
- 60. Babashah, S.; Sadeghizadeh, M.; Hajifathali, A.; Tavirani, M.R.; Zomorod, M.S.; Ghadiani, M.; Soleimani, M. Targeting of the signal transducer Smo links microRNA-326 to the oncogenic Hedgehog pathway in CD34+ CML stem/progenitor cells. *Int. J. Cancer* **2013**, *133*, 579–589. [CrossRef]
- Pellicano, F.; Simara, P.; Sinclair, A.; Helgason, G.V.; Copland, M.; Grant, S.; Holyoake, T.L. The MEK inhibitor PD184352 enhances BMS-214662-induced apoptosis in CD34+ CML stem/progenitor cells. *Leukemia* 2011, 25, 1159–1167. [CrossRef] [PubMed]
- 62. Lim, S.; Saw, T.Y.; Zhang, M.; Janes, M.R.; Nacro, K.; Hill, J.; Lim, A.Q.; Chang, C.T.; Fruman, D.A.; Rizzieri, D.A.; et al. Targeting of the MNK-eIF4E axis in blast crisis chronic myeloid leukemia inhibits leukemia stem cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E2298–E2307. [CrossRef] [PubMed]
- 63. Xiao, M.; Ai, H.; Li, T.; Rajoria, P.; Shahu, P.; Li, X. Targeting of the BLT2 in chronic myeloid leukemia inhibits leukemia stem/progenitor cell function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, 472, 610–616. [CrossRef]
- 64. Abraham, S.A.; Hopcroft, L.E.; Carrick, E.; Drotar, M.E.; Dunn, K.; Williamson, A.J.; Korfi, K.; Baquero, P.; Park, L.E.; Scott, M.T.; et al. Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells. *Nature* **2016**, *534*, 341–346. [CrossRef] [PubMed]
- 65. Bonnet, D.; Dick, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 730–737. [CrossRef]
- 66. Holyoake, T.; Jiang, X.; Eaves, C.; Eaves, A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood* **1999**, *94*, 2056–2064. [CrossRef]
- 67. Uckun, F.M.; Sather, H.; Reaman, G.; Shuster, J.; Land, V.; Trigg, M.; Gunther, R.; Chelstrom, L.; Bleyer, A.; Gaynon, P.; et al. Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **1995**, *85*, 873–878. [CrossRef] [PubMed]
- 68. Al-Hajj, M.; Wicha, M.S.; Benito-Hernandez, A.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3983–3988. [CrossRef]
- 69. O'Brien, C.A.; Pollett, A.; Gallinger, S.; Dick, J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **2007**, *445*, 106–110. [CrossRef]

- 70. Singh, S.K.; Hawkins, C.; Clarke, I.D.; Squire, J.A.; Bayani, J.; Hide, T.; Henkelman, R.M.; Cusimano, M.D.; Dirks, P.B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **2004**, *432*, 396–401. [CrossRef]
- 71. Hamilton, A.; Helgason, G.V.; Schemionek, M.; Zhang, B.; Myssina, S.; Allan, E.K.; Nicolini, F.E.; Muller-Tidow, C.; Bhatia, R.; Brunton, V.G.; et al. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood* **2012**, *119*, 1501–1510. [CrossRef] [PubMed]
- 72. Corbin, A.S.; Agarwal, A.; Loriaux, M.; Cortes, J.; Deininger, M.W.; Druker, B.J. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J. Clin. Investig.* **2011**, 121, 396–409. [CrossRef] [PubMed]
- 73. Clarke, C.J.; Holyoake, T.L. Preclinical approaches in chronic myeloid leukemia: From cells to systems. *Exp. Hematol.* **2017**, *47*, 13–23. [CrossRef]
- 74. Milojkovic, D.; Apperley, J. Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7519–7527. [CrossRef] [PubMed]
- 75. Zabriskie, M.S.; Eide, C.A.; Tantravahi, S.K.; Vellore, N.A.; Estrada, J.; Nicolini, F.E.; Khoury, H.J.; Larson, R.A.; Konopleva, M.; Cortes, J.E.; et al. BCR-ABL1 compound mutations combining key kinase domain positions confer clinical resistance to ponatinib in Ph chromosome-positive leukemia. *Cancer Cell* 2014, 26, 428–442. [CrossRef] [PubMed]
- 76. Schoepfer, J.; Jahnke, W.; Berellini, G.; Buonamici, S.; Cotesta, S.; Cowan-Jacob, S.W.; Dodd, S.; Drueckes, P.; Fabbro, D.; Gabriel, T.; et al. Discovery of Asciminib (ABL001), an Allosteric Inhibitor of the Tyrosine Kinase Activity of BCR-ABL1. *J. Med. Chem.* 2018, *61*, 8120–8135. [CrossRef] [PubMed]
- 77. Barnes, D.J.; Palaiologou, D.; Panousopoulou, E.; Schultheis, B.; Yong, A.S.; Wong, A.; Pattacini, L.; Goldman, J.M.; Melo, J.V. Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2005, 65, 8912–8919. [CrossRef]
- 78. Sattler, M.; Verma, S.; Shrikhande, G.; Byrne, C.H.; Pride, Y.B.; Winkler, T.; Greenfield, E.A.; Salgia, R.; Griffin, J.D. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 24273–24278. [CrossRef]
- 79. Kim, J.H.; Chu, S.C.; Gramlich, J.L.; Pride, Y.B.; Babendreier, E.; Chauhan, D.; Salgia, R.; Podar, K.; Griffin, J.D.; Sattler, M. Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* 2005, *105*, 1717–1723. [CrossRef]
- Burger, H.; van Tol, H.; Boersma, A.W.; Brok, M.; Wiemer, E.A.; Stoter, G.; Nooter, K. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* 2004, 104, 2940–2942. [CrossRef]
- Breedveld, P.; Pluim, D.; Cipriani, G.; Wielinga, P.; van Tellingen, O.; Schinkel, A.H.; Schellens, J.H. The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): Implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer Res.* 2005, *65*, 2577–2582. [CrossRef] [PubMed]
- Dohse, M.; Scharenberg, C.; Shukla, S.; Robey, R.W.; Volkmann, T.; Deeken, J.F.; Brendel, C.; Ambudkar, S.V.; Neubauer, A.; Bates, S.E. Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metab. Dispos.* 2010, *38*, 1371–1380. [CrossRef] [PubMed]
- Zhang, B.; Strauss, A.C.; Chu, S.; Li, M.; Ho, Y.; Shiang, K.D.; Snyder, D.S.; Huettner, C.S.; Shultz, L.; Holyoake, T.; et al. Effective targeting of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by histone deacetylase inhibitors in combination with imatinib mesylate. *Cancer Cell* 2010, *17*, 427–442. [CrossRef] [PubMed]
- Kinstrie, R.; Karamitros, D.; Goardon, N.; Morrison, H.; Hamblin, M.; Robinson, L.; Clark, R.E.; Copland, M.;
  Vyas, P. Heterogeneous leukemia stem cells in myeloid blast phase chronic myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2016, 1, 160–169. [CrossRef]
- 85. Holyoake, T.L.; Vetrie, D. The chronic myeloid leukemia stem cell: Stemming the tide of persistence. *Blood* **2017**, *129*, 1595–1606. [CrossRef]
- 86. Koschmieder, S.; Vetrie, D. Epigenetic dysregulation in chronic myeloid leukaemia: A myriad of mechanisms and therapeutic options. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, *51*, 180–197. [CrossRef]
- 87. Simon, J.A.; Kingston, R.E. Mechanisms of polycomb gene silencing: Knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 697–708. [CrossRef]

- Laugesen, A.; Helin, K. Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer. *Cell Stem Cell* 2014, 14, 735–751. [CrossRef]
- 89. Lessard, J.; Sauvageau, G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* **2003**, *423*, 255–260. [CrossRef]
- 90. Rizo, A.; Horton, S.J.; Olthof, S.; Dontje, B.; Ausema, A.; van Os, R.; van den Boom, V.; Vellenga, E.; de Haan, G.; Schuringa, J.J. BMI1 collaborates with BCR-ABL in leukemic transformation of human CD34+ cells. *Blood* **2010**, *116*, 4621–4630. [CrossRef]
- Saudy, N.S.; Fawzy, I.M.; Azmy, E.; Goda, E.F.; Eneen, A.; Abdul Salam, E.M. BMI1 gene expression in myeloid leukemias and its impact on prognosis. *Blood Cells Mol. Dis.* 2014, 53, 194–198. [CrossRef] [PubMed]
- Mourgues, L.; Imbert, V.; Nebout, M.; Colosetti, P.; Neffati, Z.; Lagadec, P.; Verhoeyen, E.; Peng, C.; Duprez, E.; Legros, L.; et al. The BMI1 polycomb protein represses cyclin G2-induced autophagy to support proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2015, *29*, 1993–2002. [CrossRef] [PubMed]
- Mohty, M.; Yong, A.S.; Szydlo, R.M.; Apperley, J.F.; Melo, J.V. The polycomb group BMI1 gene is a molecular marker for predicting prognosis of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007, 110, 380–383. [CrossRef] [PubMed]
- 94. Branford, S.; Wang, P.; Yeung, D.T.; Thomson, D.; Purins, A.; Wadham, C.; Shahrin, N.H.; Marum, J.E.; Nataren, N.; Parker, W.T.; et al. Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease. *Blood* **2018**, *132*, 948–961. [CrossRef] [PubMed]
- 95. Boultwood, J.; Perry, J.; Zaman, R.; Fernandez-Santamaria, C.; Littlewood, T.; Kusec, R.; Pellagatti, A.; Wang, L.; Clark, R.E.; Wainscoat, J.S. High-density single nucleotide polymorphism array analysis and ASXL1 gene mutation screening in chronic myeloid leukemia during disease progression. *Leukemia* 2010, 24, 1139–1145. [CrossRef]
- Menezes, J.; Salgado, R.N.; Acquadro, F.; Gomez-Lopez, G.; Carralero, M.C.; Barroso, A.; Mercadillo, F.; Espinosa-Hevia, L.; Talavera-Casanas, J.G.; Pisano, D.G.; et al. ASXL1, TP53 and IKZF3 mutations are present in the chronic phase and blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2013, *3*, e157. [CrossRef]
- 97. Yang, H.; Kurtenbach, S.; Guo, Y.; Lohse, I.; Durante, M.A.; Li, J.; Li, Z.; Al-Ali, H.; Li, L.; Chen, Z.; et al. Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood* **2018**, *131*, 328–341. [CrossRef]
- Nimmanapalli, R.; Fuino, L.; Stobaugh, C.; Richon, V.; Bhalla, K. Cotreatment with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. *Blood* 2003, 101, 3236–3239. [CrossRef]
- 99. Nimmanapalli, R.; Fuino, L.; Bali, P.; Gasparetto, M.; Glozak, M.; Tao, J.; Moscinski, L.; Smith, C.; Wu, J.; Jove, R.; et al. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or -refractory chronic myelogenous leukemia-blast crisis cells. *Cancer Res.* 2003, *63*, 5126–5135.
- 100. Fiskus, W.; Pranpat, M.; Bali, P.; Balasis, M.; Kumaraswamy, S.; Boyapalle, S.; Rocha, K.; Wu, J.; Giles, F.; Manley, P.W.; et al. Combined effects of novel tyrosine kinase inhibitor AMN107 and histone deacetylase inhibitor LBH589 against Bcr-Abl-expressing human leukemia cells. *Blood* 2006, *108*, 645–652. [CrossRef]
- 101. Wang, Z.; Yuan, H.; Roth, M.; Stark, J.M.; Bhatia, R.; Chen, W.Y. SIRT1 deacetylase promotes acquisition of genetic mutations for drug resistance in CML cells. *Oncogene* **2013**, *32*, 589–598. [CrossRef] [PubMed]
- 102. Yuan, H.; Wang, Z.; Li, L.; Zhang, H.; Modi, H.; Horne, D.; Bhatia, R.; Chen, W. Activation of stress response gene SIRT1 by BCR-ABL promotes leukemogenesis. *Blood* **2012**, *119*, 1904–1914. [CrossRef]
- 103. Roman-Gomez, J.; Castillejo, J.A.; Jimenez, A.; Cervantes, F.; Boque, C.; Hermosin, L.; Leon, A.; Granena, A.; Colomer, D.; Heiniger, A.; et al. Cadherin-13, a mediator of calcium-dependent cell-cell adhesion, is silenced by methylation in chronic myeloid leukemia and correlates with pretreatment risk profile and cytogenetic response to interferon alfa. *J. Clin. Oncol.* 2003, *21*, 1472–1479. [CrossRef] [PubMed]
- 104. San Jose-Eneriz, E.; Agirre, X.; Jimenez-Velasco, A.; Cordeu, L.; Martin, V.; Arqueros, V.; Garate, L.; Fresquet, V.; Cervantes, F.; Martinez-Climent, J.A.; et al. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *Eur. J. Cancer* 2009, 45, 1877–1889. [CrossRef] [PubMed]
- 105. Koh, Y.; Kim, D.Y.; Park, S.H.; Byun, H.M.; Kim, I.; Yoon, S.S.; Kim, B.K.; Park, E.; Yang, A.S.; Park, S. Increased BCR promoter DNA methylation status strongly correlates with favorable response to imatinib in chronic myeloid leukemia patients. *Oncol. Lett.* **2011**, *2*, 181–187. [CrossRef] [PubMed]

- 106. Liu, T.C.; Lin, S.F.; Chang, J.G.; Yang, M.Y.; Hung, S.Y.; Chang, C.S. Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in chronic myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2003**, *123*, 654–661. [CrossRef] [PubMed]
- 107. Chen, Q.; Lin, J.; Qian, J.; Deng, Z.Q.; Qian, W.; Yang, J.; Li, Y.; Chen, X.X.; Ma, Y.J.; Ma, J.C.; et al. The methylation status of the DDX43 promoter in Chinese patients with chronic myeloid leukemia. *Genet. Test. Mol. Biomark.* **2013**, *17*, 508–511. [CrossRef]
- 108. Ahmad, I.; Mir, R.; Javid, J.; Farooq, S.; Yadav, P.; Zuberi, M.; Masroor, M.; Gupta, N.; Ray, P.C.; Saxena, A. Epigenetic Silencing of P16 (INK4a) Gene by Promoter Hypermethylation in Chronic Myelogenous Leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2014, 14, S139. [CrossRef]
- 109. Nagy, E.; Beck, Z.; Kiss, A.; Csoma, E.; Telek, B.; Konya, J.; Olah, E.; Rak, K.; Toth, F.D. Frequent methylation of p16INK4A and p14ARF genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase. *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 2298–2305. [CrossRef]
- 110. Bodoor, K.; Haddad, Y.; Alkhateeb, A.; Al-Abbadi, A.; Dowairi, M.; Magableh, A.; Bsoul, N.; Ghabkari, A. DNA hypermethylation of cell cycle (p15 and p16) and apoptotic (p14, p53, DAPK and TMS1) genes in peripheral blood of leukemia patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2014, *15*, 75–84. [CrossRef]
- 111. Qian, J.; Wang, Y.L.; Lin, J.; Yao, D.M.; Xu, W.R.; Wu, C.Y. Aberrant methylation of the death-associated protein kinase 1 (DAPK1) CpG island in chronic myeloid leukemia. *Eur. J. Haematol.* 2009, *82*, 119–123. [CrossRef] [PubMed]
- 112. Pehlivan, M.; Sercan, Z.; Sercan, H.O. sFRP1 promoter methylation is associated with persistent Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **2009**, *33*, 1062–1067. [CrossRef] [PubMed]
- 113. Jelinek, J.; Gharibyan, V.; Estecio, M.R.; Kondo, K.; He, R.; Chung, W.; Lu, Y.; Zhang, N.; Liang, S.; Kantarjian, H.M.; et al. Aberrant DNA methylation is associated with disease progression, resistance to imatinib and shortened survival in chronic myelogenous leukemia. *PLoS ONE* 2011, 6, e22110. [CrossRef] [PubMed]
- 114. Maupetit-Mehouas, S.; Court, F.; Bourgne, C.; Guerci-Bresler, A.; Cony-Makhoul, P.; Johnson, H.; Etienne, G.; Rousselot, P.; Guyotat, D.; Janel, A.; et al. DNA methylation profiling reveals a pathological signature that contributes to transcriptional defects of CD34(+) CD15(-) cells in early chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Mol. Oncol.* 2018, *12*, 814–829. [CrossRef]
- 115. Janssen, J.J.; Denkers, F.; Valk, P.; Cornelissen, J.J.; Schuurhuis, G.J.; Ossenkoppele, G.J. Methylation patterns in CD34 positive chronic myeloid leukemia blast crisis cells. *Haematologica* **2010**, *95*, 1036–1037. [CrossRef]
- 116. Oki, Y.; Kantarjian, H.M.; Gharibyan, V.; Jones, D.; O'Brien, S.; Verstovsek, S.; Cortes, J.; Morris, G.M.; Garcia-Manero, G.; Issa, J.P. Phase II study of low-dose decitabine in combination with imatinib mesylate in patients with accelerated or myeloid blastic phase of chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2007, 109, 899–906. [CrossRef]
- Pelechano, V.; Steinmetz, L.M. Gene regulation by antisense transcription. *Nat. Rev. Genet.* 2013, 14, 880–893.
   [CrossRef]
- 118. Lu, Y.; Li, Y.; Chai, X.; Kang, Q.; Zhao, P.; Xiong, J.; Wang, J. Long noncoding RNA HULC promotes cell proliferation by regulating PI3K/AKT signaling pathway in chronic myeloid leukemia. *Gene* 2017, 607, 41–46. [CrossRef]
- 119. Sun, C.; Luan, S.; Zhang, G.; Wang, N.; Shao, H.; Luan, C. CEBPA-mediated upregulation of the lncRNA PLIN2 promotes the development of chronic myelogenous leukemia via the GSK3 and Wnt/beta-catenin signaling pathways. *Am. J. Cancer Res.* 2017, *7*, 1054–1067.
- 120. Guo, G.; Kang, Q.; Zhu, X.; Chen, Q.; Wang, X.; Chen, Y.; Ouyang, J.; Zhang, L.; Tan, H.; Chen, R.; et al. A long noncoding RNA critically regulates Bcr-Abl-mediated cellular transformation by acting as a competitive endogenous RNA. *Oncogene* 2015, 34, 1768–1779. [CrossRef]
- 121. Li, Z.; Yang, L.; Liu, X.; Nie, Z.; Luo, J. Long noncoding RNA MEG3 inhibits proliferation of chronic myeloid leukemia cells by sponging microRNA21. *Biomed. Pharm.* **2018**, *104*, 181–192. [CrossRef] [PubMed]
- 122. Agirre, X.; Jimenez-Velasco, A.; San Jose-Eneriz, E.; Garate, L.; Bandres, E.; Cordeu, L.; Aparicio, O.; Saez, B.; Navarro, G.; Vilas-Zornoza, A.; et al. Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. *Mol. Cancer Res.* 2008, *6*, 1830–1840. [CrossRef] [PubMed]
- 123. Flamant, S.; Ritchie, W.; Guilhot, J.; Holst, J.; Bonnet, M.L.; Chomel, J.C.; Guilhot, F.; Turhan, A.G.; Rasko, J.E. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2010, 95, 1325–1333. [CrossRef] [PubMed]

- Machova Polakova, K.; Lopotova, T.; Klamova, H.; Burda, P.; Trneny, M.; Stopka, T.; Moravcova, J. Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets. *Mol. Cancer* 2011, *10*, 41. [CrossRef] [PubMed]
- 125. Zhu, X.; Lin, Z.; Du, J.; Zhou, X.; Yang, L.; Liu, G. Studies on microRNAs that are correlated with the cancer stem cells in chronic myeloid leukemia. *Mol. Cell Biochem.* **2014**, *390*, 75–84. [CrossRef] [PubMed]
- 126. Kotagama, K.; Chang, Y.; Mangone, M. miRNAs as Biomarkers in Chronic Myelogenous Leukemia. *Drug Dev. Res.* 2015, *76*, 278–285. [CrossRef] [PubMed]
- 127. San Jose-Eneriz, E.; Roman-Gomez, J.; Jimenez-Velasco, A.; Garate, L.; Martin, V.; Cordeu, L.; Vilas-Zornoza, A.; Rodriguez-Otero, P.; Calasanz, M.J.; Prosper, F.; et al. MicroRNA expression profiling in Imatinib-resistant Chronic Myeloid Leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations. *Mol. Cancer* 2009, *8*, 69. [CrossRef]
- 128. Salati, S.; Salvestrini, V.; Carretta, C.; Genovese, E.; Rontauroli, S.; Zini, R.; Rossi, C.; Ruberti, S.; Bianchi, E.; Barbieri, G.; et al. Deregulated expression of miR-29a-3p, miR-494-3p and miR-660-5p affects sensitivity to tyrosine kinase inhibitors in CML leukemic stem cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 49451–49469. [CrossRef]
- 129. Li, Y.; Yuan, Y.; Tao, K.; Wang, X.; Xiao, Q.; Huang, Z.; Zhong, L.; Cao, W.; Wen, J.; Feng, W. Inhibition of BCR/ABL protein expression by miR-203 sensitizes for imatinib mesylate. *PLoS ONE* 2013, *8*, e61858. [CrossRef]
- Zhang, B.; Nguyen, L.X.T.; Li, L.; Zhao, D.; Kumar, B.; Wu, H.; Lin, A.; Pellicano, F.; Hopcroft, L.; Su, Y.L.; et al. Bone marrow niche trafficking of miR-126 controls the self-renewal of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Nat. Med.* 2018, 24, 450–462. [CrossRef]
- 131. Di Bacco, A.; Keeshan, K.; McKenna, S.L.; Cotter, T.G. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: Deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist* **2000**, *5*, 405–415. [CrossRef]
- Fernandez-Luna, J.L. Bcr-Abl and inhibition of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Apoptosis* 2000, 5, 315–318. [CrossRef] [PubMed]
- 133. Tzifi, F.; Economopoulou, C.; Gourgiotis, D.; Ardavanis, A.; Papageorgiou, S.; Scorilas, A. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Adv. Hematol.* 2012, 2012. [CrossRef] [PubMed]
- 134. Guillem, V.; Amat, P.; Collado, M.; Cervantes, F.; Alvarez-Larran, A.; Martinez, J.; Tormo, E.; Eroles, P.; Solano, C.; Hernandez-Boluda, J.C. BCL2 gene polymorphisms and splicing variants in chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 2015, 39, 1278–1284. [CrossRef]
- Kim, D.H.; Xu, W.; Ma, C.; Liu, X.; Siminovitch, K.; Messner, H.A.; Lipton, J.H. Genetic variants in the candidate genes of the apoptosis pathway and susceptibility to chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009, 113, 2517–2525. [CrossRef] [PubMed]
- Deming, P.B.; Schafer, Z.T.; Tashker, J.S.; Potts, M.B.; Deshmukh, M.; Kornbluth, S. Bcr-Abl-mediated protection from apoptosis downstream of mitochondrial cytochrome c release. *Mol. Cell Biol.* 2004, 24, 10289–10299. [CrossRef] [PubMed]
- Bento, C.F.; Renna, M.; Ghislat, G.; Puri, C.; Ashkenazi, A.; Vicinanza, M.; Menzies, F.M.; Rubinsztein, D.C. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu. Rev. Biochem.* 2016, *85*, 685–713. [CrossRef] [PubMed]
- 138. Rothe, K.; Porter, V.; Jiang, X. Current Outlook on Autophagy in Human Leukemia: Foe in Cancer Stem Cells and Drug Resistance, Friend in New Therapeutic Interventions. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 461. [CrossRef]
- 139. Rothe, K.; Lin, H.; Lin, K.B.; Leung, A.; Wang, H.M.; Malekesmaeili, M.; Brinkman, R.R.; Forrest, D.L.; Gorski, S.M.; Jiang, X. The core autophagy protein ATG4B is a potential biomarker and therapeutic target in CML stem/progenitor cells. *Blood* 2014, 123, 3622–3634. [CrossRef]
- 140. Sheng, Z.; Ma, L.; Sun, J.E.; Zhu, L.J.; Green, M.R. BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription. *Blood* **2011**, *118*, 2840–2848. [CrossRef]
- 141. Martinelli, G.; Oehler, V.G.; Papayannidis, C.; Courtney, R.; Shaik, M.N.; Zhang, X.; O'Connell, A.; McLachlan, K.R.; Zheng, X.; Radich, J.; et al. Treatment with PF-04449913, an oral smoothened antagonist, in patients with myeloid malignancies: A phase 1 safety and pharmacokinetics study. *Lancet Haematol.* 2015, 2, e339–e346. [CrossRef]
- DeYoung, M.P.; Horak, P.; Sofer, A.; Sgroi, D.; Ellisen, L.W. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.* 2008, 22, 239–251. [CrossRef] [PubMed]

- 143. Ianniciello, A.; Dumas, P.Y.; Drullion, C.; Guitart, A.; Villacreces, A.; Peytour, Y.; Chevaleyre, J.; Brunet de la Grange, P.; Vigon, I.; Desplat, V.; et al. Chronic myeloid leukemia progenitor cells require autophagy when leaving hypoxia-induced quiescence. *Oncotarget* 2017, *8*, 96984–96992. [CrossRef] [PubMed]
- 144. Schepers, K.; Campbell, T.B.; Passegue, E. Normal and leukemic stem cell niches: Insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* **2015**, *16*, 254–267. [CrossRef]
- 145. Shah, M.; Bhatia, R. Preservation of Quiescent Chronic Myelogenous Leukemia Stem Cells by the Bone Marrow Microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1100*, 97–110. [CrossRef]
- 146. Zhang, B.; Ho, Y.W.; Huang, Q.; Maeda, T.; Lin, A.; Lee, S.U.; Hair, A.; Holyoake, T.L.; Huettner, C.; Bhatia, R. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell* 2012, 21, 577–592. [CrossRef]
- 147. Bhatia, R.; Wayner, E.A.; McGlave, P.B.; Verfaillie, C.M. Interferon-alpha restores normal adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors to bone marrow stroma by correcting impaired beta 1 integrin receptor function. *J. Clin. Investig.* **1994**, *94*, 384–391. [CrossRef]
- Bhatia, R.; McCarthy, J.B.; Verfaillie, C.M. Interferon-alpha restores normal beta 1 integrin-mediated inhibition of hematopoietic progenitor proliferation by the marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1996, *87*, 3883–3891. [CrossRef]
- 149. Krause, D.S.; Lazarides, K.; von Andrian, U.H.; Van Etten, R.A. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 1175–1180. [CrossRef]
- 150. Krause, D.S.; Lazarides, K.; Lewis, J.B.; von Andrian, U.H.; Van Etten, R.A. Selectins and their ligands are required for homing and engraftment of BCR-ABL1+ leukemic stem cells in the bone marrow niche. *Blood* 2014, 123, 1361–1371. [CrossRef]
- Hu, Y.; Chen, Y.; Douglas, L.; Li, S. beta-Catenin is essential for survival of leukemic stem cells insensitive to kinase inhibition in mice with BCR-ABL-induced chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009, 23, 109–116. [CrossRef] [PubMed]
- 152. Zhang, B.; Li, M.; McDonald, T.; Holyoake, T.L.; Moon, R.T.; Campana, D.; Shultz, L.; Bhatia, R. Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt-beta-catenin signaling. *Blood* **2013**, *121*, 1824–1838. [CrossRef] [PubMed]
- 153. Laperrousaz, B.; Jeanpierre, S.; Sagorny, K.; Voeltzel, T.; Ramas, S.; Kaniewski, B.; Ffrench, M.; Salesse, S.; Nicolini, F.E.; Maguer-Satta, V. Primitive CML cell expansion relies on abnormal levels of BMPs provided by the niche and on BMPRIb overexpression. *Blood* **2013**, *122*, 3767–3777. [CrossRef] [PubMed]
- 154. Grockowiak, E.; Laperrousaz, B.; Jeanpierre, S.; Voeltzel, T.; Guyot, B.; Gobert, S.; Nicolini, F.E.; Maguer-Satta, V. Immature CML cells implement a BMP autocrine loop to escape TKI treatment. *Blood* 2017, 130, 2860–2871. [CrossRef] [PubMed]
- 155. Agarwal, P.; Isringhausen, S.; Li, H.; Paterson, A.J.; He, J.; Gomariz, A.; Nagasawa, T.; Nombela-Arrieta, C.; Bhatia, R. Mesenchymal Niche-Specific Expression of Cxcl12 Controls Quiescence of Treatment-Resistant Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell* **2019**, *24*, 769–784.e766. [CrossRef] [PubMed]
- 156. Weisberg, E.; Azab, A.K.; Manley, P.W.; Kung, A.L.; Christie, A.L.; Bronson, R.; Ghobrial, I.M.; Griffin, J.D. Inhibition of CXCR4 in CML cells disrupts their interaction with the bone marrow microenvironment and sensitizes them to nilotinib. *Leukemia* 2012, *26*, 985–990. [CrossRef] [PubMed]
- 157. Herrmann, H.; Sadovnik, I.; Cerny-Reiterer, S.; Rulicke, T.; Stefanzl, G.; Willmann, M.; Hoermann, G.; Bilban, M.; Blatt, K.; Herndlhofer, S.; et al. Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood* **2014**, *123*, 3951–3962. [CrossRef]
- 158. Willmann, M.; Sadovnik, I.; Eisenwort, G.; Entner, M.; Bernthaler, T.; Stefanzl, G.; Hadzijusufovic, E.; Berger, D.; Herrmann, H.; Hoermann, G.; et al. Evaluation of cooperative antileukemic effects of nilotinib and vildagliptin in Ph(+) chronic myeloid leukemia. *Exp. Hematol.* **2018**, *57*, 50–59.e56. [CrossRef]
- 159. Reynaud, D.; Pietras, E.; Barry-Holson, K.; Mir, A.; Binnewies, M.; Jeanne, M.; Sala-Torra, O.; Radich, J.P.; Passegue, E. IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development. *Cancer Cell* 2011, 20, 661–673. [CrossRef]
- 160. Schepers, K.; Pietras, E.M.; Reynaud, D.; Flach, J.; Binnewies, M.; Garg, T.; Wagers, A.J.; Hsiao, E.C.; Passegue, E. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell* **2013**, *13*, 285–299. [CrossRef]

- 161. Welner, R.S.; Amabile, G.; Bararia, D.; Czibere, A.; Yang, H.; Zhang, H.; Pontes, L.L.; Ye, M.; Levantini, E.; Di Ruscio, A.; et al. Treatment of chronic myelogenous leukemia by blocking cytokine alterations found in normal stem and progenitor cells. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 671–681. [CrossRef] [PubMed]
- 162. Zhang, X.; Tu, H.; Yang, Y.; Jiang, X.; Hu, X.; Luo, Q.; Li, J. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia via the IL-7/JAK1/STAT5 pathway. J. Biol. Chem. 2019, 294, 12167–12179. [CrossRef]
- 163. Prost, S.; Relouzat, F.; Spentchian, M.; Ouzegdouh, Y.; Saliba, J.; Massonnet, G.; Beressi, J.P.; Verhoeyen, E.; Raggueneau, V.; Maneglier, B.; et al. Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPARgamma agonists. *Nature* 2015, 525, 380–383. [CrossRef]
- 164. Glodkowska-Mrowka, E.; Manda-Handzlik, A.; Stelmaszczyk-Emmel, A.; Seferynska, I.; Stoklosa, T.; Przybylski, J.; Mrowka, P. PPARgamma ligands increase antileukemic activity of second- and third-generation tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia cells. *Blood Cancer J.* 2016, *6*, e377. [CrossRef]
- 165. Zhou, H.S.; Carter, B.Z.; Andreeff, M. Bone marrow niche-mediated survival of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia: Yin and Yang. *Cancer Biol. Med.* **2016**, *13*, 248–259. [CrossRef] [PubMed]
- 166. Zhang, H.; Li, H.; Xi, H.S.; Li, S. HIF1alpha is required for survival maintenance of chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood* **2012**, *119*, 2595–2607. [CrossRef]
- 167. Ng, K.P.; Manjeri, A.; Lee, K.L.; Huang, W.; Tan, S.Y.; Chuah, C.T.; Poellinger, L.; Ong, S.T. Physiologic hypoxia promotes maintenance of CML stem cells despite effective BCR-ABL1 inhibition. *Blood* 2014, 123, 3316–3326. [CrossRef] [PubMed]
- 168. Ilander, M.; Kreutzman, A.; Mustjoki, S. IFNalpha induces prolonged remissions modeling curative immunologic responses in chronic myeloid leukemia. *Oncoimmunology* **2014**, *3*, e28781. [CrossRef]
- 169. Bruck, O.; Blom, S.; Dufva, O.; Turkki, R.; Chheda, H.; Ribeiro, A.; Kovanen, P.; Aittokallio, T.; Koskenvesa, P.; Kallioniemi, O.; et al. Immune cell contexture in the bone marrow tumor microenvironment impacts therapy response in CML. *Leukemia* 2018, *32*, 1643–1656. [CrossRef] [PubMed]
- Bachy, E.; Bernaud, J.; Roy, P.; Rigal, D.; Nicolini, F.E. Quantitative and functional analyses of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells in chronic phase chronic myeloid leukaemia patients at diagnosis and on imatinib mesylate. *Br. J. Haematol.* 2011, 153, 139–143. [CrossRef] [PubMed]
- 171. Christiansson, L.; Soderlund, S.; Svensson, E.; Mustjoki, S.; Bengtsson, M.; Simonsson, B.; Olsson-Stromberg, U.; Loskog, A.S. Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55818. [CrossRef]
- 172. Riether, C.; Gschwend, T.; Huguenin, A.L.; Schurch, C.M.; Ochsenbein, A.F. Blocking programmed cell death 1 in combination with adoptive cytotoxic T-cell transfer eradicates chronic myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2015, 29, 1781–1785. [CrossRef] [PubMed]
- 173. Sweet, K.; Hazlehurst, L.; Sahakian, E.; Powers, J.; Nodzon, L.; Kayali, F.; Hyland, K.; Nelson, A.; Pinilla-Ibarz, J. A phase I clinical trial of ruxolitinib in combination with nilotinib in chronic myeloid leukemia patients with molecular evidence of disease. *Leuk. Res.* **2018**, *74*, 89–96. [CrossRef] [PubMed]
- 174. Pawelec, G.; Da Silva, P.; Max, H.; Kalbacher, H.; Schmidt, H.; Bruserud, O.; Zugel, U.; Baier, W.; Rehbein, A.; Pohla, H. Relative roles of natural killer- and T cell-mediated anti-leukemia effects in chronic myelogenous leukemia patients treated with interferon-alpha. *Leuk. Lymphoma* **1995**, *18*, 471–478. [CrossRef] [PubMed]
- 175. de Castro, F.A.; Palma, P.V.; Morais, F.R.; Simoes, B.P.; Carvalho, P.V.; Ismael, S.J.; Lima, C.P.; Voltarelli, J.C. Immunological effects of interferon-alpha on chronic myelogenous leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2003, 44, 2061–2067. [CrossRef] [PubMed]
- 176. Burchert, A.; Muller, M.C.; Kostrewa, P.; Erben, P.; Bostel, T.; Liebler, S.; Hehlmann, R.; Neubauer, A.; Hochhaus, A. Sustained molecular response with interferon alfa maintenance after induction therapy with imatinib plus interferon alfa in patients with chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 1429–1435. [CrossRef]
- 177. Preudhomme, C.; Guilhot, J.; Nicolini, F.E.; Guerci-Bresler, A.; Rigal-Huguet, F.; Maloisel, F.; Coiteux, V.; Gardembas, M.; Berthou, C.; Vekhoff, A.; et al. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 2511–2521. [CrossRef]

- 178. Simonsson, B.; Gedde-Dahl, T.; Markevarn, B.; Remes, K.; Stentoft, J.; Almqvist, A.; Bjoreman, M.; Flogegard, M.; Koskenvesa, P.; Lindblom, A.; et al. Combination of pegylated IFN-alpha2b with imatinib increases molecular response rates in patients with low- or intermediate-risk chronic myeloid leukemia. *Blood* 2011, 118, 3228–3235. [CrossRef]
- 179. Nemkov, T.; D'Alessandro, A.; Reisz, J.A. Metabolic underpinnings of leukemia pathology and treatment. *Cancer Rep.* **2019**, 2, e1139. [CrossRef]
- 180. A, J.; Qian, S.; Wang, G.; Yan, B.; Zhang, S.; Huang, Q.; Ni, L.; Zha, W.; Liu, L.; Cao, B.; et al. Chronic myeloid leukemia patients sensitive and resistant to imatinib treatment show different metabolic responses. *PLoS ONE* 2010, 5, e13186. [CrossRef]
- 181. Karlikova, R.; Siroka, J.; Friedecky, D.; Faber, E.; Hrda, M.; Micova, K.; Fikarova, I.; Gardlo, A.; Janeckova, H.; Vrobel, I.; et al. Metabolite Profiling of the Plasma and Leukocytes of Chronic Myeloid Leukemia Patients. *J. Proteome Res.* 2016, *15*, 3158–3166. [CrossRef] [PubMed]
- 182. Hattori, A.; Tsunoda, M.; Konuma, T.; Kobayashi, M.; Nagy, T.; Glushka, J.; Tayyari, F.; McSkimming, D.; Kannan, N.; Tojo, A.; et al. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia. *Nature* 2017, 545, 500–504. [CrossRef] [PubMed]
- 183. Jones, C.L.; Stevens, B.M.; D'Alessandro, A.; Reisz, J.A.; Culp-Hill, R.; Nemkov, T.; Pei, S.; Khan, N.; Adane, B.; Ye, H.; et al. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell* 2018, 34, 724–740 e724. [CrossRef] [PubMed]
- 184. Dou, Q.; Chen, H.N.; Wang, K.; Yuan, K.; Lei, Y.; Li, K.; Lan, J.; Chen, Y.; Huang, Z.; Xie, N.; et al. Ivermectin Induces Cytostatic Autophagy by Blocking the PAK1/Akt Axis in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2016, 76, 4457–4469. [CrossRef] [PubMed]
- 185. Ye, H.; Adane, B.; Khan, N.; Sullivan, T.; Minhajuddin, M.; Gasparetto, M.; Stevens, B.; Pei, S.; Balys, M.; Ashton, J.M.; et al. Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell* **2016**, *19*, 23–37. [CrossRef]
- 186. Lagadinou, E.D.; Sach, A.; Callahan, K.; Rossi, R.M.; Neering, S.J.; Minhajuddin, M.; Ashton, J.M.; Pei, S.; Grose, V.; O'Dwyer, K.M.; et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 329–341. [CrossRef] [PubMed]
- 187. Hu, J.; Feng, M.; Liu, Z.L.; Liu, Y.; Huang, Z.L.; Li, H.; Feng, W.L. Potential role of Wnt/beta-catenin signaling in blastic transformation of chronic myeloid leukemia: Cross talk between beta-catenin and BCR-ABL. *Tumour Biol.* 2016, 39. [CrossRef]
- 188. Gregory, M.A.; Phang, T.L.; Neviani, P.; Alvarez-Calderon, F.; Eide, C.A.; O'Hare, T.; Zaberezhnyy, V.; Williams, R.T.; Druker, B.J.; Perrotti, D.; et al. Wnt/Ca2+/NFAT signaling maintains survival of Ph+ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl. *Cancer Cell* 2010, *18*, 74–87. [CrossRef]
- 189. Zhao, C.; Blum, J.; Chen, A.; Kwon, H.Y.; Jung, S.H.; Cook, J.M.; Lagoo, A.; Reya, T. Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell* **2007**, *12*, 528–541. [CrossRef]
- Schurch, C.; Riether, C.; Matter, M.S.; Tzankov, A.; Ochsenbein, A.F. CD27 signaling on chronic myelogenous leukemia stem cells activates Wnt target genes and promotes disease progression. *J. Clin. Investig.* 2012, 122, 624–638. [CrossRef]
- 191. Zhao, C.; Chen, A.; Jamieson, C.H.; Fereshteh, M.; Abrahamsson, A.; Blum, J.; Kwon, H.Y.; Kim, J.; Chute, J.P.; Rizzieri, D.; et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 2009, 458, 776–779. [CrossRef] [PubMed]
- Jain, S.K.; Langdon, W.Y.; Varticovski, L. Tyrosine phosphorylation of p120cbl in BCR/abl transformed hematopoietic cells mediates enhanced association with phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 1997, 14, 2217–2228. [CrossRef] [PubMed]
- 193. Chai, S.K.; Nichols, G.L.; Rothman, P. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J. Immunol.* **1997**, *159*, 4720–4728.
- 194. de Groot, R.P.; Raaijmakers, J.A.; Lammers, J.W.; Koenderman, L. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 2000, *3*, 299–305. [CrossRef] [PubMed]
- 195. McCubrey, J.A.; Steelman, L.S.; Abrams, S.L.; Bertrand, F.E.; Ludwig, D.E.; Basecke, J.; Libra, M.; Stivala, F.; Milella, M.; Tafuri, A.; et al. Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia* 2008, 22, 708–722. [CrossRef]

- 196. Danisz, K.; Blasiak, J. Role of anti-apoptotic pathways activated by BCR/ABL in the resistance of chronic myeloid leukemia cells to tyrosine kinase inhibitors. *Acta Biochim. Pol.* **2013**, *60*, 503–514. [CrossRef]
- 197. Fu, Z.; Tindall, D.J. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* 2008, 27, 2312–2319. [CrossRef]
- Burchert, A.; Wang, Y.; Cai, D.; von Bubnoff, N.; Paschka, P.; Muller-Brusselbach, S.; Ottmann, O.G.; Duyster, J.; Hochhaus, A.; Neubauer, A. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia* 2005, 19, 1774–1782. [CrossRef]
- 199. Samanta, A.; Perazzona, B.; Chakraborty, S.; Sun, X.; Modi, H.; Bhatia, R.; Priebe, W.; Arlinghaus, R. Janus kinase 2 regulates Bcr-Abl signaling in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **2011**, *25*, 463–472. [CrossRef]
- Modi, H.; Li, L.; Chu, S.; Rossi, J.; Yee, J.K.; Bhatia, R. Inhibition of Grb2 expression demonstrates an important role in BCR-ABL-mediated MAPK activation and transformation of primary human hematopoietic cells. *Leukemia* 2011, 25, 305–312. [CrossRef]
- 201. Ohanian, M.; Tari Ashizawa, A.; Garcia-Manero, G.; Pemmaraju, N.; Kadia, T.; Jabbour, E.; Ravandi, F.; Borthakur, G.; Andreeff, M.; Konopleva, M.; et al. Liposomal Grb2 antisense oligodeoxynucleotide (BP1001) in patients with refractory or relapsed haematological malignancies: A single-centre, open-label, dose-escalation, phase 1/1b trial. *Lancet Haematol.* **2018**, *5*, e136–e146. [CrossRef]
- 202. Reddiconto, G.; Toto, C.; Palama, I.; De Leo, S.; de Luca, E.; De Matteis, S.; Dini, L.; Passerini, C.G.; Di Renzo, N.; Maffia, M.; et al. Targeting of GSK3beta promotes imatinib-mediated apoptosis in quiescent CD34+ chronic myeloid leukemia progenitors, preserving normal stem cells. *Blood* 2012, *119*, 2335–2345. [CrossRef] [PubMed]
- 203. Li, J.J.; Li, S.A. Mitotic kinases: The key to duplication, segregation, and cytokinesis errors, chromosomal instability, and oncogenesis. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *111*, 974–984. [CrossRef] [PubMed]
- 204. Giles, F.J.; Cortes, J.; Jones, D.; Bergstrom, D.; Kantarjian, H.; Freedman, S.J. MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood* **2007**, *109*, 500–502. [CrossRef]
- 205. Giles, F.J.; Swords, R.T.; Nagler, A.; Hochhaus, A.; Ottmann, O.G.; Rizzieri, D.A.; Talpaz, M.; Clark, J.; Watson, P.; Xiao, A.; et al. MK-0457, an Aurora kinase and BCR-ABL inhibitor, is active in patients with BCR-ABL T315I leukemia. *Leukemia* **2013**, *27*, 113–117. [CrossRef]
- 206. Seymour, J.F.; Kim, D.W.; Rubin, E.; Haregewoin, A.; Clark, J.; Watson, P.; Hughes, T.; Dufva, I.; Jimenez, J.L.; Mahon, F.X.; et al. A phase 2 study of MK-0457 in patients with BCR-ABL T315I mutant chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J.* 2014, 4, e238. [CrossRef]
- 207. Giustacchini, A.; Thongjuea, S.; Barkas, N.; Woll, P.S.; Povinelli, B.J.; Booth, C.A.G.; Sopp, P.; Norfo, R.; Rodriguez-Meira, A.; Ashley, N.; et al. Single-cell transcriptomics uncovers distinct molecular signatures of stem cells in chronic myeloid leukemia. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 692–702. [CrossRef]
- 208. Kizilors, A.; Crisa, E.; Lea, N.; Passera, R.; Mian, S.; Anwar, J.; Best, S.; Nicolini, F.E.; Ireland, R.; Aldouri, M.; et al. Effect of low-level BCR-ABL1 kinase domain mutations identified by next-generation sequencing in patients with chronic myeloid leukaemia: A population-based study. *Lancet Haematol.* 2019, *6*, e276–e284. [CrossRef]
- 209. Soverini, S.; Mancini, M.; Bavaro, L.; Cavo, M.; Martinelli, G. Chronic myeloid leukemia: The paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy. *Mol. Cancer* 2018, *17*, 49. [CrossRef]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## Conclusion



# Figure 28 : Schéma récapitulatif des modes d'action du BJE6 et de l'ALX combinées aux ITKs.

Mon travail de thèse m'a permis dans un premier temps de démontrer l'efficacité de l'utilisation d'un inhibiteur de PKCδ, le BJE6, avec les ITKs ciblant BCR-ABL dans la LMC. La deuxième partie de mon travail a mis en avant l'utilisation de l'ALX combinée avec un ITK pour éliminer les cellules leucémiques. L'ensemble de ces éléments est synthétisé sous la forme d'un schéma ci-dessus regroupant les deux axes d'études.

L'inhibition de la PKCõ (avec le BJE6) ou de la chaîne respiratoire mitochondriale (avec l'ALX) combinée avec celle de BCR-ABL (avec les ITKs) recoupent leur synergie d'action au niveau mitochondrial avec un renforcement de la réponse apoptotique induite par les ITKs. Cette augmentation de la réponse apoptotique se traduit au niveau moléculaire par une cinétique d'action plus précoce avec une forte dépolarisation mitochondriale, une augmentation de l'expression des formes clivées de Caspase 3 et PARP ainsi qu'une forte diminution de l'expression de membres anti-apoptotiques. Ces synergies moléculaires que nous avons pu décrire permettent l'élimination des CSLs, qui demeurent insensibles à l'utilisation des ITKs en monothérapie.

En conclusion, le ciblage de l'axe BCR-ABL/BMI1 dans la LMC présente un intérêt thérapeutique majeur soit en affectant les voies de signalisations en amont de BMI1 par l'inhibition de la PKCδ ou en aval par l'utilisation de l'ALX.

### Discussion générale.

Le concept de thérapie ciblée fut concrétisé pour la première fois en cancérologie avec l'utilisation du mésylate d'imatinib (ou Gleevec®) (Druker, Tamura et al. 1996) comme traitement de la LMC. Depuis, deux autres générations d'ITKs se sont succédé visant à se substituer à l'imatinib lorsque celle-ci n'était soit mal tolérée soit inefficace. Par ailleurs, ces nouveaux ITKs ciblent tous d'autres kinases en plus de BCR-ABL, comme les kinases de la famille Src ou encore les Aurora kinases pouvant expliquer leurs différences d'effets selon les patients. Néanmoins, aucun ne semble à ce jour suffisamment efficace pour permettre de soigner durablement la maladie, la principale cause de cet échec étant attribuée à l'absence de sensibilité des CSLs pour ces ITKs. En effet, les CSL demeurent insensibles aux traitements utilisés. Ces cellules ne sont en effet que peu ou pas sensible aux ITKs que ce soit l'Imatinib (Graham, Jorgensen et al. 2002), le Dasatinib (Copland, Hamilton et al. 2006), le Nilotinib (Jorgensen, Allan et al. 2007) ou le Bosutinib (Konig, Holyoake et al. 2008). Désormais, de nombreuses études se sont orientées vers la mise en évidence de voies moléculaires exacerbées dans les CSLs permettant d'envisager leur ciblage conjointement au traitement conventionnel par ITK comme par exemple la voie N-cadhérine/Wnt-β-catenin (Zhang, Li et al. 2013), la voie hedgehog (Dierks, Beigi et al. 2008) (Dierks, Beigi et al. 2008) ou encore STAT5 (Hoelbl, Schuster et al. 2010, Prost, Relouzat et al. 2015) qui sont toutes trois impliquées dans le maintien des CSL. De nombreuses solutions ont ainsi émergé in vitro, ex-vivo et pour certaines ont donné lieu à la mise en place d'essais cliniques, ce que nous avons synthétisé sous la forme d'un schéma dans la revue IJMS. Dans ce travail de thèse j'ai pu démontrer qu'il était possible de re-sensibiliser les CSLs à l'imatinib par deux approches différentes convergeant au niveau mitochondrial, l'une aboutissant à la disparition des molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et l'autre conduisant à une perte de la respiration mitochondriale.

#### L'axe BCR-ABL/PKCδ/BMI1.

L'intérêt d'étudier le rôle de BMI1 dans la LMC tient au fait que ce répresseur transcriptionnel est nécessaire au maintien de l'auto-renouvellement à la fois des cellules souches

hématopoïétiques mais également des CSLs (Lessard and Sauvageau 2003, Park, Qian et al. 2003).

Les premières études concernant l'implication de BMI1 dans la LMC ont mis en évidence que le niveau d'expression de BMI1 augmentait avec la progression de la maladie vers ses phases les plus agressives (Siddique, Parray et al. 2013) et ont ainsi permis de le proposer comme marqueur de pronostic (Mohty, Yong et al. 2007, Rizo, Horton et al. 2010). Il a également été rapporté que sa présence était requise pour une transformation durable de cellules CD34<sup>+</sup>, issues de cordons ombilicaux humains, avec l'oncogène BCR-ABL (Rizo, Horton et al. 2010). De plus, BMI1 a été impliqué dans l'accélération de la croissance tumorale et mimant la progression de la phase chronique vers la phase blastique lorsqu'il est surexprimé dans un modèle murin de la pathologie (expression ectopique du gène *BCR-ABL* dans le compartiment des cellules souches hématopoïétiques) (Sengupta, Ficker et al. 2012).

Cibler les capacités d'auto-renouvellement des cellules initiatrices de cancer à travers l'inhibition de BMI1 apparaissait ainsi opportun et a pu montrer son intérêt dans le cancer du côlon (Kreso, van Galen et al. 2014), mais son efficacité n'est toujours pas démontrée au niveau clinique.

L'absence d'activité enzymatique portée par BMI1 le rend difficile à cibler pharmacologiquement et incite à agir sur une étape biochimique en amont de cet oncogène pour atteindre les CSLs. Cependant, bien que BMI1 est retrouvé surexprimé dans de nombreux cancers peu de choses sont connues sur les voies de signalisation ou les facteurs qui sont responsables de cette expression. Le fait que l'expression ectopique de BCR-ABL dans la lignée cellulaire HEK293 soit suffisante pour induire une forte activité du promoteur de BMI1 (Bhattacharyya, Mihara et al. 2009) suggère l'existence d'un ou plusieurs intermédiaires entre BCR-ABL et le répresseur transcriptionnel. Parmi les nombreuses kinases stimulées par BCR-ABL notre choix s'est porté sur la PKCδ en se basant notamment sur la démonstration de son rôle dans les CSCs récemment décrit (Lee, Fang et al. 2018)

La PKC $\delta$  peut avoir des rôles très différents selon le type cellulaire ainsi que le contexte environnemental. Dans le cas de la LMC le rôle de la PKC $\delta$  est plus ambigu, il semblerait qu'elle puisse participer aux stades les plus précoces de l'initiation de la pathologie par BCR-ABL (Kin, Shibuya et al. 2001) (Kin, Shibuya et al. 2001) mais elle a également été désignée comme étant en partie responsable des effets antitumoraux que peut avoir l'interféron  $\alpha$  sur les cellules de LMC (Kaur, Parmar et al. 2005). Cependant, cette dernière étude montrait un tel effet dans une lignée de LMC exprimant des niveaux faibles de PKC $\delta$  (cellules KT-1) et dans cette étude les auteurs ont utilisé exclusivement la rottlerin laquelle a été démontrée agir sur la chaine respiratoire (Kaur, Parmar et al. 2005). En revanche, une étude récente a présenté l'élaboration de nouveaux inhibiteurs de PKCō qui s'avèrent bien plus spécifique de cette kinase que la rottlerin (Chen, Forman et al. 2014). Dans cette même étude, en inhibant l'activité de la PKCδ, ces molécules induisent un ralentissement de la prolifération cellulaire ainsi que la mort cellulaire des CSCs de plusieurs types de cancer (prostate, pancréas, seins et mélanomes). C'est l'un de ces inhibiteurs, le BJE6-106 que nous avons utilisé dans notre étude. Après avoir démontré l'existence d'un axe BCR-ABL/PKCδ/BMI1 en utilisant différentes constructions moléculaires et plusieurs lignées de LMC, nous avons décrit que cet axe était responsable du maintien d'un pool de CSLs à partir d 'échantillons médullaires de patients LMC. Nos résultats ont montré qu'il était possible d'utiliser une approche pharmacologique pour cibler la PKC $\delta$  afin de diminuer la fréquence des CSLs et de compromettre leur survie. Par ailleurs nous avons rapporté qu'il y avait un intérêt majeur à combiner cette approche pharmacologique avec n'importe lequel des ITKs proposé en clinique pour éliminer à la fois les cellules LMC proliférantes et le CSLs. Nous avons également décrit que les mécanismes moléculaires impliqués pour atteindre le compartiment CSL concernaient la perte des membres anti-apoptotiques Bcl-xL, Bcl-2 et Mcl1 impliquées dans la survie des CSLs (Hogdal and Letai 2013, Lagadinou, Sach et al. 2013) et contre lesquels différentes stratégies de ciblages ont émergé ces dernières années (Muselli, Peyron et al. 2019).

En agissant en amont de l'expression de BMI1 par le ciblage de la PKCδ il est donc possible d'agir sur la fonction de la molécule polycomb dans le maintien des CSLs. Cette approche représente ainsi un fort intérêt thérapeutique dans le contexte du ciblage des CSL de LMC pour obtenir un traitement définitif en évitant les cas de rechutes après arrêt du traitement.

#### L'alexidine comme traitement anticancéreux :

Une approche bioinformatique, via la base de données Cmap, nous a permis d'identifier une molécule pharmacologique capable d'induire le profil transcriptomique généré par l'extinction de BMI1 dans les cellules de LMC. L'alexidine dihydrochloride (ALX) appartient à la famille des bis-biguanides, proche des biguanides comme la metformine et la phenformine qui ont principalement été utilisés comme antidiabétiques. Depuis quelques années les études utilisant la metformine comme traitement anticancéreux en monothérapie ou en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques se sont multipliées, tout comme les traitements utilisant des activateurs de l'AMPK (Rosilio, Ben-Sahra et al. 2014). La metformine, en activant l'AMPK a d'ailleurs été démontrée induire la mort des cellules de LMC (Vakana, Altman et al. 2011). C'est ce que nous avons également observé en utilisant l'ALX qui s'est révélée capable de stimuler la phosphorylation de l'AMPK et ceci à la fois dans des cellules sensibles à l'IMA et des cellules résistantes à cet ITK et d'induire la mort cellulaire.

Utilisée à une dose n'affectant pas la différenciation des cellules CD34+ de donneurs sains, l'ALX réduit fortement le potentiel clonogénique des cellules CD34+ provenant de la moelle osseuse de patients LMC. Des expériences de LTC-IC et de marguages au CFSE ont permis de démontrer que l'ALX seule affectait le compartiment souche leucémique dans un ordre de grandeur similaire à celui de l'action de l'IMA mais que la combinaison des deux molécules réduisait drastiquement la fréquence des cellules souches leucémiques. La transduction de l'oncogène BCR-ABL dans des cellules CD34+ de cordon ombilical, a permis de préciser que l'action de l'ALX était exclusivement délétère contre des cellules exprimant cet oncogène. L'environnement stromal représente également un frein élevé à l'efficacité du traitement par ITK (Bruck, Blom et al. 2018). Par des expériences de co-cultures de lignées LMC sur support stromal, dans lesquelles ce type de résistance peut être visualisé, la combinaison de l'ALX avec l'IMA a permis aux cellules de LMC de retrouver une sensibilité à l'ITK comparable à celle de ces mêmes cellules cultivées en absence de cellules stromales. L'opportunité de tester l'ALX sur des cellules CD34+ issues de moelle osseuse de patients n'ayant pas répondu à l'IMA a révélé que ce bisbiguanide avait également la capacité de resensibiliser ces cellules à l'ITK.

Les premières expériences « in-vivo » ont démontré que l'ALX était capable d'atteindre les cellules leucémiques dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate en diminuant 6 fois plus leur expression à ce niveau par rapport à l'IMA avec en plus une mortalité trois supérieure par rapport à l'ITK.

Dans tous les cas, l'ajout de l'ALX perturbe des mécanismes moléculaires dans les cellules de LMC, qu'elles soient proliférantes ou souches/progénitrices, leur conférant une sensibilité accrue à l'égard d'un ITK.

Par analogie avec le mode d'action de la metformine qui interfère notamment avec la respiration mitochondriale, nous avons démontré que l'ALX seule est capable d'impacter rapidement et durablement la respiration mitochondriale et ceci pourrait être la conséquence de l'inhibition de la tyrosine phosphatase mitochondriale PTPMT1 dont l'un des substrats est la succinate déshydrogénase (SDH) qui correspond au deuxième complexe de la chaîne respiratoire (Nath, Ryu et al. 2015). Dans ce contexte, l'inhibition de PTPMT1 par l'ALX favoriserait ainsi une augmentation de l'activité de la SDH qui provoquerait une consommation excessive de succinate (Nath, Ryu et al. 2015). Par ailleurs, la SDH représente une enzyme « carrefour » en étant est à la fois un acteur important de la chaîne respiratoire mais également du cycle TCA, soulignant son rôle essentiel dans le métabolisme mitochondrial pour lequel la dépendance est nettement à l'avantage des CSLs par rapport aux CSHs.

#### **Perspectives :**

Nos travaux ont mis en évidence deux types d'approches distinctes au niveau de l'axe BCR-ABL/BMI1 aboutissant dans les deux cas à une sensibilisation des CSLs aux ITKs permettant, dans le cas d'une association avec n'importe quel ITK de diminuer drastiquement la fréquence des CSLs. Les deux approches ont mis en évidence des modes d'action quelque peu différents avec néanmoins une convergence au niveau mitochondrial. Dans le cas de l'inhibition de la PKCδ, les conséquences les plus significatives sur le plan moléculaire concernent la disparition des membres anti-apoptotiques ce qui correspond à une stratégie déjà imaginée pour cibler les CSLs (Lagadinou, Sach et al. 2013) ou dans d'autres types de cancer (Lee, Fang et al. 2018).

Dans le cas de l'ALX, nous observons une inhibition de la chaîne respiratoire qui, là encore, représente une stratégie déjà expérimentée pour éliminer les CSLs, comme par exemple avec la tigecycline (Kuntz, Baguero et al. 2017). Si la metformine avait suscité des espoirs de pouvoir être repositionné en thérapie anti-cancéreuse, les doses nécessaires à son application thérapeutique sont très élevées. L'intérêt s'était ensuite reporté sur la Phenformine, utilisable à des concentrations inférieures au mg, mais ses effets cyto-hépatiques l'ont disqualifié. L'utilisation de l'ALX ex-vivo et in-vivo a montré qu'il était possible de l'utiliser à des doses 1000 fois inférieures à celles requises pour la metformine, notamment pour atteindre le compartiment souche leucémique leucémiques ce qui pourrait en faire une molécule intéressante en clinique. La suite de ce travail consistera à renforcer les résultats déjà obtenus concernant nos expériences in-vivo, et en particulier il sera pertinent de déterminer les doses efficaces d'ALX en combinaison avec l'IMA pour leur capacité à éliminer les cellules leucémiques ayant colonisé les organes lymphoïdes secondaires. Il sera également important de pouvoir définir les doses minimales de chacune des deux molécules permettant de conserver leur efficacité combinatoire comme nous avons pu l'observer in vitro avec nos calculs de synergie.

D'un point de vue métabolique, les effets de l'ALX devront être davantage précisés. En effet, la littérature fournit peu d'informations à l'heure actuelle sur son mode d'action même si plusieurs papiers ont récemment émergé pour souligner son efficacité comme agent anticancéreux induisant de l'apoptose dans l'adénocarcinome gastrique (Chen, Zou et al. 2019), le cancer de la tête et du cou (Yip, Ito et al. 2006), du pancréas (Kasikci, Aydemir et al. 2020). D'un point de vue mécanistique, l'ALX est surtout décrite pour inhiber la protéine tyrosine phosphatase PTPMT1 (Doughty-Shenton, Joseph et al. 2010). La localisation exclusive de cette protéine, au niveau de la membrane mitochondriale interne faisant face à la matrice mitochondriale, la place à proximité de la chaîne de transport des électrons,

suggérant un rôle important qu'il conviendrait d'approfondir plus amplement. PTPMT1 est essentielle à la fonction mitochondriale par sa fonction régulatrice de la synthèse des cardiolipines parce qu'elle déphosphoryle le phosphatidylglycerol phosphate (PGP) en phosphatidylglycerol PG, les cardiolipines étant des phospholipides spécifiques aux mitochondries responsables de leur intégrité membranaire (Zhang, Guan et al. 2011). De plus, PTPMT1 est capable d'inhiber directement la succinate déshydrogénase (SDH) plus connue sous le nom de complexe II de la chaîne respiratoire (Nath, Ryu et al. 2015) dont l'inhibition par des agents pharmacologiques comme les bisbiguanides a déjà pu être démontrée.

Dans notre modèle, nous avons pu monter que l'ALX perturbe fortement l'activité mitochondriale en inhibant totalement la chaîne respiratoire mitochondriale. Il conviendra de vérifier si cette inhibition pourrait être contrecarrée par l'expression d'une forme constitutivement active de PTPMT1 dans nos lignées cellulaires afin de confirmer le lien entre l'inhibition de PTPMT1 et l'inhibition de l'activité mitochondriale : nos premiers résultats semblent étayer cette hypothèse dans la mesure où nous avons pu observer une diminution très importante des niveaux protéiques de PTPMT1 sous ALX. De plus, nous pourrions compléter cette analyse en évaluant l'effet de l'ALX sur les niveaux de cardiolipines dans nos modèles cellulaires. Nous pourrions ainsi nous retrouver dans le schéma suivant où l'inhibition de PTPMT1 par l'ALX conduirait à une très forte inhibition de l'activité mitochondriale en lien avec une forte diminution des niveaux de cardiolipines et à une mort cellulaire des cellules cancéreuses.

A l'heure actuelle, de nombreuses stratégies de ciblages des CSCs ont pu émerger notamment dans la LMC en combinant des molécules ciblant des voies de signalisations tout ou parties différentes de celles ciblées par les ITKs (Muselli, Peyron et al. 2019). Ainsi, limiter l'adaptabilité des CSCs semble être une piste prometteuse pour permettre leur élimination, et le ciblage du métabolisme cellulaire fait partie des pistes envisagées. En effet, limiter la reprogrammation métabolique des CSCs pourrait donc réduire considérablement la capacité de ces cellules à s'adapter à leur environnement. PTPMT1 étant un acteur central du métabolisme mitochondrial, il pourrait jouer un rôle majeur dans le switch métabolique qu'opèrent les CSCs pour répondre à leurs besoins cellulaires dont la résistance aux traitements et donc l'inhibition de cette protéine réduirait considérablement leur plasticité métabolique. Dans ce contexte, l'inhibition de PTPMT1 par l'ALX pourrait constituer un outil majeur dans la mesure où l'inhibition de PTPMT1 induirait une crise métabolique suffisant dans les CSCs soit pour les sensibiliser aux thérapies actuellement présentes en clinique soit en conduisant à leur mort cellulaire.

Enfin, pour repositionner davantage l'ensemble de ces travaux sur l'ALX par rapport à BMI1, il serait intéressant de s'intéresser aux processus cellulaires en aval de la signalisation médiée par BMI1 comme les voies de dommages à l'ADN, l'autorenouvellement, le cycle cellulaire, le stress oxydatif ou encore l'apoptose p53 dépendante. Certaines pistes semblent effectivement prometteuses comme l'étude du stress oxydatif via la synthèse de ROS par rapport aux effets de l'ALX sur les processus mitochondriaux. De plus, certains éléments de la littérature vont également dans ce sens dans la mesure où par exemple l'ALX, identifiée par un crible du Cmap, est prédite pour agir sur la voie p53 dans l'adénocarcinome gastrique sans que le mécanisme y soit précisé (Chen, Zou et al. 2019). Un autre exemple allant dans le sens de cette argumentation décrit une inhibition du cycle cellulaire par l'ALX dans des lignés de cancer du pancréas (Kasikci, Aydemir et al. 2020).

De plus, l'action de l'ALX pourra avoir un intérêt majeur pour resensibiliser des patients nonrépondeurs aux ITKs ou chez des patients en rechute après l'arrêt du traitement de première ligne. Enfin, l'utilisation combinée ALX/ITK qui ciblent des voies de signalisation bien distinctes permettra de limiter l'émergence de résistances secondaires.

En dernier lieu, la possibilité de combinaison avec n'importe quel ITK utilisé en clinique, permettra éventuellement de proposer des traitements plus personnalisés.

## Références

(1968). "Chronic granulocytic leukaemia: comparison of radiotherapy and busulphan therapy. Report of the Medical Research Council's working party for therapeutic trials in leukaemia." <u>Br Med J</u> **1**(5586): 201-208.

(1992). "A prospective comparison of alpha-IFN and conventional chemotherapy in Ph+ chronic myeloid leukemia. Clinical and cytogenetic results at 2 years in 322 patients. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia." <u>Haematologica</u> **77**(3): 204-214.

Abdouh, M., et al. (2012). "Bmi1 is down-regulated in the aging brain and displays antioxidant and protective activities in neurons." <u>PLoS One</u> **7**(2): e31870.

Abramson, S., et al. (1977). "The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems." J Exp Med **145**(6): 1567-1579.

Agrawal, M., et al. (2014). "MDR1 expression predicts outcome of Ph+ chronic phase CML patients on second-line nilotinib therapy after imatinib failure." <u>Leukemia</u> **28**(7): 1478-1485.

Ai, D. I., et al. (2015). "Extramedullary blast crisis as initial presentation in chronic myeloid leukemia with the e1a2 BCR-ABL1 transcript: A case report." <u>Mol Clin Oncol</u> **3**(6): 1319-1322.

Ai, J. and R. V. Tiu (2014). "Practical management of patients with chronic myeloid leukemia who develop tyrosine kinase inhibitor-resistant BCR-ABL1 mutations." <u>Ther Adv Hematol</u> **5**(4): 107-120.

Airiau, K., et al. (2013). "PI3K/mTOR pathway inhibitors sensitize chronic myeloid leukemia stem cells to nilotinib and restore the response of progenitors to nilotinib in the presence of stem cell factor." <u>Cell Death Dis</u> **4**: e827.

Al-Hajj, M., et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> **100**(7): 3983-3988.

Amsberg, G. K. and S. Koschmieder (2013). "Profile of bosutinib and its clinical potential in the treatment of chronic myeloid leukemia." <u>Onco Targets Ther</u> **6**: 99-106.

Apperley, J. F. (2007). "Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia." Lancet Oncol **8**(11): 1018-1029.

Ardail, D., et al. (1990). "Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics." J Biol Chem **265**(31): 18797-18802.

Arranz, L., et al. (2014). "Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms." <u>Nature</u> **512**(7512): 78-81.

Baccarani, M., et al. (2006). "Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet." <u>Blood</u> **108**(6): 1809-1820.

Bae, K. M., et al. (2007). "Protein kinase C epsilon is overexpressed in primary human non-small cell lung cancers and functionally required for proliferation of non-small cell lung cancer cells in a p21/Cip1-dependent manner." <u>Cancer Res</u> **67**(13): 6053-6063.

Balakrishnan, I., et al. (2020). "Senescence Induced by BMI1 Inhibition Is a Therapeutic Vulnerability in H3K27M-Mutant DIPG." <u>Cell Rep</u> **33**(3): 108286.

Barnes, D. J., et al. (2005). "Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia." <u>Cancer Res</u> **65**(19): 8912-8919.

Baskiewicz-Masiuk, M., et al. (2003). "The influence of STAT5 antisense oligonucleotides on the proliferation and apoptosis of selected human leukaemic cell lines." <u>Cell Prolif</u> **36**(5): 265-278.

Basu, A. and D. Pal (2010). "Two faces of protein kinase Cdelta: the contrasting roles of PKCdelta in cell survival and cell death." <u>ScientificWorldJournal</u> **10**: 2272-2284.

Battula, V. L., et al. (2017). "AML-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells supports leukemia growth." JCI Insight **2**(13).

Baudot, A. D., et al. (2009). "The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression." <u>Oncogene</u> **28**(37): 3261-3273.

Bavaro, L., et al. (2019). "Mechanisms of Disease Progression and Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Chronic Myeloid Leukemia: An Update." Int J Mol Sci **20**(24).

Bernaudo, S., et al. (2017). "Epidermal growth factor promotes cyclin G2 degradation via calpainmediated proteolysis in gynaecological cancer cells." <u>PLoS One</u> **12**(6): e0179906.

Bhaskar, P. T. and N. Hay (2007). "The two TORCs and Akt." <u>Dev Cell</u> **12**(4): 487-502.

Bhattacharyya, J., et al. (2009). "BMI-1 expression is enhanced through transcriptional and posttranscriptional regulation during the progression of chronic myeloid leukemia." <u>Ann Hematol</u> **88**(4): 333-340.

Blay, P., et al. (2004). "Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias." <u>Clin Cancer Res</u> **10**(12 Pt 1): 4089-4095.

Blogowska, A., et al. (2005). "Body composition, dehydroepiandrosterone sulfate and leptin concentrations in girls approaching menarche." J Pediatr Endocrinol Metab **18**(10): 975-983.

Blogowski, W., et al. (2012). "Adipose tissue as a potential source of hematopoietic stem/progenitor cells." <u>Obesity (Silver Spring)</u> **20**(5): 923-931.

Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." <u>Nat Med</u> **3**(7): 730-737.

Bonnet, S., et al. (2007). "A mitochondria-K+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth." <u>Cancer Cell</u> **11**(1): 37-51.

Boyd, A. L., et al. (2014). "Niche displacement of human leukemic stem cells uniquely allows their competitive replacement with healthy HSPCs." <u>J Exp Med</u> **211**(10): 1925-1935.

Boyd, A. L., et al. (2017). "Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelo-erythropoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche." <u>Nat Cell Biol</u> **19**(11): 1336-1347.

Boyd, K. J., et al. (2018). "Molecular Dynamics Analysis of Cardiolipin and Monolysocardiolipin on Bilayer Properties." <u>Biophys J</u> **114**(9): 2116-2127.

Branford, S., et al. (2002). "High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance." <u>Blood</u> **99**(9): 3472-3475.

Branford, S., et al. (2003). "Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis." <u>Blood</u> **102**(1): 276-283.

Bruck, O., et al. (2018). "Immune cell contexture in the bone marrow tumor microenvironment impacts therapy response in CML." <u>Leukemia</u> **32**(7): 1643-1656.

Buchwald, G., et al. (2006). "Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b." <u>EMBO J</u> **25**(11): 2465-2474.

Calvi, L. M., et al. (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." <u>Nature</u> **425**(6960): 841-846.

Carlesso, N., et al. (1996). "Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl." <u>J Exp</u> <u>Med</u> **183**(3): 811-820.

Carracedo, A., et al. (2013). "Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight." <u>Nat Rev Cancer</u> **13**(4): 227-232.

Castilla, C., et al. (2013). "PTPL1 and PKCdelta contribute to proapoptotic signalling in prostate cancer cells." <u>Cell Death Dis</u> **4**: e576.

Cedar, H. and Y. Bergman (2011). "Epigenetics of haematopoietic cell development." <u>Nat Rev Immunol</u> **11**(7): 478-488.

Chatoo, W., et al. (2009). "The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity." <u>J Neurosci</u> **29**(2): 529-542.

Chen, J. L., et al. (2009). "PKC delta signaling: a dual role in regulating hypoxic stress-induced autophagy and apoptosis." <u>Autophagy</u> **5**(2): 244-246.

Chen, J. Q., et al. (2014). "Changes in the expression of cyclin G2 in esophageal cancer cell and its significance." <u>Tumour Biol</u> **35**(4): 3355-3362.

Chen, Y., et al. (2016). "Inhibition of pentose phosphate pathway suppresses acute myelogenous leukemia." <u>Tumour Biol</u> **37**(5): 6027-6034.

Chen, Z., et al. (2011). "Protein kinase Cdelta inactivation inhibits cellular proliferation and decreases survival in human neuroendocrine tumors." <u>Endocr Relat Cancer</u> **18**(6): 759-771.

Chen, Z., et al. (2014). "Protein kinase C-delta inactivation inhibits the proliferation and survival of cancer stem cells in culture and in vivo." <u>BMC Cancer</u> **14**: 90.

Chen, Z. X., et al. (2019). "Identification of putative drugs for gastric adenocarcinoma utilizing differentially expressed genes and connectivity map." <u>Mol Med Rep</u> **19**(2): 1004-1015.

Christofk, H. R., et al. (2008). "The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth." <u>Nature</u> **452**(7184): 230-233.

Cole, A., et al. (2015). "Inhibition of the Mitochondrial Protease ClpP as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia." <u>Cancer Cell</u> **27**(6): 864-876.

Collins, A. T., et al. (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." <u>Cancer Res</u> **65**(23): 10946-10951.

Copland, M., et al. (2006). "Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction." <u>Blood</u> **107**(11): 4532-4539.

Cordeiro Gomes, A., et al. (2016). "Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation." <u>Immunity</u> **45**(6): 1219-1231.

Cortes, J. E., et al. (2012). "Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias." <u>N</u> Engl J Med **367**(22): 2075-2088.

Cortes, J. E., et al. (1995). "Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia with rearrangement of the breakpoint cluster region. Long-term follow-up results." <u>Cancer</u> **75**(2): 464-470.

Cortes, J. E., et al. (1996). "Chronic myelogenous leukemia: a review." Am J Med 100(5): 555-570.

Costello, R., et al. (1995). "Philadelphia chromosome-negative chronic myeloid leukaemia: a report of 14 new cases." <u>Br J Haematol</u> **90**(2): 346-352.

Crossman, L. C., et al. (2005). "hOCT 1 and resistance to imatinib." <u>Blood</u> **106**(3): 1133-1134; author reply 1134.

Daley, G. Q., et al. (1990). "Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome." <u>Science</u> **247**(4944): 824-830.

Davies, A., et al. (2009). "Nilotinib concentration in cell lines and primary CD34(+) chronic myeloid leukemia cells is not mediated by active uptake or efflux by major drug transporters." <u>Leukemia</u> **23**(11): 1999-2006.

de Groot, R. P., et al. (2000). "STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells." <u>Mol Cell Biol Res Commun</u> **3**(5): 299-305.

DeBerardinis, R. J. and C. B. Thompson (2012). "Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us?" <u>Cell</u> **148**(6): 1132-1144.

Deininger, M. W., et al. (2000). "The molecular biology of chronic myeloid leukemia." <u>Blood</u> **96**(10): 3343-3356.

Dierks, C., et al. (2008). "Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation." <u>Cancer Cell</u> **14**(3): 238-249.

Dimri, M., et al. (2016). "A miR-200c/141-BMI1 autoregulatory loop regulates oncogenic activity of BMI1 in cancer cells." <u>Oncotarget</u> **7**(24): 36220-36234.

Ding, L. and S. J. Morrison (2013). "Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches." <u>Nature</u> **495**(7440): 231-235.

Doepfner, K. T., et al. (2007). "Recent patents of gene sequences relative to the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and their relevance to drug discovery." <u>Recent Pat DNA Gene Seq</u> **1**(1): 9-23.

Doughty-Shenton, D., et al. (2010). "Pharmacological targeting of the mitochondrial phosphatase PTPMT1." J Pharmacol Exp Ther **333**(2): 584-592.

Druker, B. J., et al. (2006). "Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia." <u>N Engl J Med</u> **355**(23): 2408-2417.

Druker, B. J., et al. (2001). "Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia." <u>N Engl J Med</u> **344**(14): 1031-1037.

Druker, B. J., et al. (1996). "Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells." <u>Nat Med</u> **2**(5): 561-566.

Duarte, D., et al. (2018). "Inhibition of Endosteal Vascular Niche Remodeling Rescues Hematopoietic Stem Cell Loss in AML." <u>Cell Stem Cell</u> **22**(1): 64-77 e66.

Dudek, J. (2017). "Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways." <u>Front Cell Dev Biol</u> **5**: 90.

Duhrsen, U. and D. K. Hossfeld (1996). "Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases." <u>Ann Hematol</u> **73**(2): 53-70.

Dulucq, S., et al. (2008). "Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia." <u>Blood</u> **112**(5): 2024-2027.

Eadie, L. N., et al. (2017). "The clinical significance of ABCB1 overexpression in predicting outcome of CML patients undergoing first-line imatinib treatment." <u>Leukemia</u> **31**(1): 75-82.

Eadie, L. N., et al. (2014). "Interaction of the efflux transporters ABCB1 and ABCG2 with imatinib, nilotinib, and dasatinib." <u>Clin Pharmacol Ther</u> **95**(3): 294-306.

Eide, C. A., et al. (2019). "Combining the Allosteric Inhibitor Asciminib with Ponatinib Suppresses Emergence of and Restores Efficacy against Highly Resistant BCR-ABL1 Mutants." <u>Cancer Cell</u> **36**(4): 431-443 e435.

Eiring, A. M., et al. (2014). "STAT3 as a mediator of BCR-ABL1-independent resistance in chronic myeloid leukemia." <u>Leuk Suppl</u> **3**(Suppl 1): S5-6.

Eley, T., et al. (2009). "Phase I study of the effect of gastric acid pH modulators on the bioavailability of oral dasatinib in healthy subjects." J Clin Pharmacol **49**(6): 700-709.

Eliasson, P. and J. I. Jonsson (2010). "The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be." <u>J Cell Physiol</u> **222**(1): 17-22.

Faderl, S., et al. (1999). "The biology of chronic myeloid leukemia." <u>N Engl J Med</u> **341**(3): 164-172.

Fliedner, T. M., et al. (2002). "Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure." <u>Cancer Biother Radiopharm</u> **17**(4): 405-426.

Franke, T. F., et al. (1997). "Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate." <u>Science</u> **275**(5300): 665-668.

Frenette, P. S., et al. (2013). "Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine." <u>Annu Rev Immunol</u> **31**: 285-316.

Frisch, B. J., et al. (2012). "Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia." <u>Blood</u> **119**(2): 540-550.

Fukawa, T., et al. (2016). "Excessive fatty acid oxidation induces muscle atrophy in cancer cachexia." Nat Med **22**(6): 666-671.

Galton, D. A. (1953). "Myleran in chronic myeloid leukaemia; results of treatment." <u>Lancet</u> **264**(6753): 208-213.

Gambacorti-Passerini, C., et al. (2000). "Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571." J Natl Cancer Inst **92**(20): 1641-1650.

Gambacorti-Passerini, C. B., et al. (2003). "Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias." <u>Lancet Oncol</u> **4**(2): 75-85.

Gao, W., et al. (2012). "mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer." <u>ISRN</u> <u>Otolaryngol</u> **2012**: 953089.

Garg, R., et al. (2014). "Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not." <u>Oncogene</u> **33**(45): 5225-5237.

Garofalo, R. S., et al. (2003). "Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta." <u>J Clin Invest</u> **112**(2): 197-208.

Geelen, I. G. P., et al. (2018). "Validation of the EUTOS long-term survival score in a recent independent cohort of "real world" CML patients." <u>Leukemia</u> **32**(10): 2299-2303.

Gelelete, C. B., et al. (2011). "Overweight as a prognostic factor in children with acute lymphoblastic leukemia." <u>Obesity (Silver Spring)</u> **19**(9): 1908-1911.

Ghobrial, I. M., et al. (2018). "The bone-marrow niche in MDS and MGUS: implications for AML and MM." <u>Nat Rev Clin Oncol</u> **15**(4): 219-233.

Giannoudis, A., et al. (2014). "The clinical significance of ABCC3 as an imatinib transporter in chronic myeloid leukaemia." <u>Leukemia</u> **28**(6): 1360-1363.

Gil, J. and G. Peters (2006). "Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **7**(9): 667-677.

Giordanetto, F. and R. T. Kroemer (2002). "Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7." <u>Protein Eng</u> **15**(9): 727-737.

Giustacchini, A., et al. (2017). "Single-cell transcriptomics uncovers distinct molecular signatures of stem cells in chronic myeloid leukemia." <u>Nat Med</u> **23**(6): 692-702.

Glinsky, G. V., et al. (2005). "Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer." <u>J Clin Invest</u> **115**(6): 1503-1521.

Goldman, J. M. and B. J. Druker (2001). "Chronic myeloid leukemia: current treatment options." <u>Blood</u> **98**(7): 2039-2042.

Gomel, R., et al. (2007). "The localization of protein kinase Cdelta in different subcellular sites affects its proapoptotic and antiapoptotic functions and the activation of distinct downstream signaling pathways." <u>Mol Cancer Res</u> **5**(6): 627-639.

Gorre, M. E., et al. (2001). "Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification." <u>Science</u> **293**(5531): 876-880.

Graham, S. M., et al. (2002). "Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro." <u>Blood</u> **99**(1): 319-325.

Granatowicz, A., et al. (2015). "An Overview and Update of Chronic Myeloid Leukemia for Primary Care Physicians." <u>Korean J Fam Med</u> **36**(5): 197-202.

Greenbaum, A., et al. (2013). "CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance." <u>Nature</u> **495**(7440): 227-230.

Gregory, M. A., et al. (2019). "Targeting Glutamine Metabolism and Redox State for Leukemia Therapy." <u>Clin Cancer Res</u> **25**(13): 4079-4090.

Griner, E. M. and M. G. Kazanietz (2007). "Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer." <u>Nat Rev Cancer</u> **7**(4): 281-294.

Grockowiak, E., et al. (2017). "Immature CML cells implement a BMP autocrine loop to escape TKI treatment." <u>Blood</u> **130**(26): 2860-2871.

Gromicho, M., et al. (2013). "Instability of mRNA expression signatures of drug transporters in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib." <u>Oncol Rep</u> **29**(2): 741-750.

Guilhot, F., et al. (1997). "Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group." <u>N Engl J Med</u> **337**(4): 223-229.

Gurska, L. M., et al. (2019). "Signaling Pathways in Leukemic Stem Cells." Adv Exp Med Biol 1143: 1-39.

Gustafson, W. C., et al. (2004). "Bcr-Abl regulates protein kinase Ciota (PKCiota) transcription via an Elk1 site in the PKCiota promoter." <u>The Journal of biological chemistry</u> **279**(10): 9400-9408.

Gustafson, W. C., et al. (2004). "Bcr-Abl regulates protein kinase Ciota (PKCiota) transcription via an Elk1 site in the PKCiota promoter." J Biol Chem **279**(10): 9400-9408.

Hamad, A., et al. (2013). "Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells." <u>Stem Cells Int</u> **2013**: 724360.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." <u>Cell</u> **144**(5): 646-674.

Hanoun, M., et al. (2014). "Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche." <u>Cell Stem Cell</u> **15**(3): 365-375.

Haouala, A., et al. (2011). "Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib." <u>Blood</u> **117**(8): e75-87.

Hasford, J., et al. (2011). "Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score." <u>Blood</u> **118**(3): 686-692.

Hasford, J., et al. (1998). "A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group." J Natl Cancer Inst **90**(11): 850-858.

Hayakawa, Y., et al. (2017). "Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling." <u>Cancer Cell</u> **31**(1): 21-34.

Hehlmann, R., et al. (1993). "The German CML study, comparison of busulfan vs. hydroxyurea vs. interferon alpha and establishment of prognostic score 1." <u>Leuk Lymphoma</u> **11 Suppl 1**: 159-168.

Hiwase, D. K., et al. (2008). "Dasatinib cellular uptake and efflux in chronic myeloid leukemia cells: therapeutic implications." <u>Clin Cancer Res</u> **14**(12): 3881-3888.

Hochhaus, A., et al. (2002). "Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy." <u>Leukemia</u> **16**(11): 2190-2196.

Hochhaus, A., et al. (2009). "Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia." <u>Leukemia</u> **23**(6): 1054-1061.

Hoelbl, A., et al. (2010). "Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia." <u>EMBO Mol Med</u> **2**(3): 98-110.

Hogdal, L. J. and A. Letai (2013). "BCL-2 inhibition: stemming the tide of myeloid malignancies." <u>Cell</u> <u>Stem Cell</u> **12**(3): 269-270.

Hsu, W. L., et al. (2013). "The incidence of leukemia, lymphoma and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950-2001." <u>Radiat Res</u> **179**(3): 361-382.

Huang, R., et al. (2011). "MYCN and MYC regulate tumor proliferation and tumorigenesis directly through BMI1 in human neuroblastomas." <u>FASEB J</u> **25**(12): 4138-4149.

Huang, W. S., et al. (2010). "Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-y l)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant." J Med Chem **53**(12): 4701-4719.

Hughes, T., et al. (2009). "Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase." J Clin Oncol **27**(25): 4204-4210.

Ilaria, R. L., Jr. and R. A. Van Etten (1996). "P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members." J Biol Chem **271**(49): 31704-31710.

Illmer, T., et al. (2004). "P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate." <u>Leukemia</u> **18**(3): 401-408.

Jabbour, E., et al. (2015). "Use of second- and third-generation tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia: an evolving treatment paradigm." <u>Clin Lymphoma Myeloma Leuk</u> **15**(6): 323-334.

Jabbour, E., et al. (2011). "Chronic myeloid leukemia: mechanisms of resistance and treatment." <u>Hematol Oncol Clin North Am</u> **25**(5): 981-995, v.

Jacque, N., et al. (2015). "Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition." <u>Blood</u> **126**(11): 1346-1356.

James, C., et al. (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera." <u>Nature **434**</u>(7037): 1144-1148.

Jang, B. C., et al. (2004). "Tetrandrine-induced apoptosis is mediated by activation of caspases and PKC-delta in U937 cells." <u>Biochem Pharmacol</u> **67**(10): 1819-1829.

Jeanpierre, S., et al. (2021). "The quiescent fraction of chronic myeloid leukemic stem cells depends on BMPR1B, Stat3 and BMP4-niche signals to persist in patients in remission." <u>Haematologica</u> **106**(1): 111-122.

Jia, L., et al. (2020). "BMI1 Inhibition Eliminates Residual Cancer Stem Cells after PD1 Blockade and Activates Antitumor Immunity to Prevent Metastasis and Relapse." <u>Cell Stem Cell</u> **27**(2): 238-253 e236.

Jin, M., et al. (2014). "miRNA-128 suppresses prostate cancer by inhibiting BMI-1 to inhibit tumorinitiating cells." <u>Cancer Res</u> **74**(15): 4183-4195.

Jones, C. L., et al. (2018). "Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells." <u>Cancer Cell</u> **34**(5): 724-740 e724.

Jones, D., et al. (2009). "Laboratory practice guidelines for detecting and reporting BCR-ABL drug resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a report of the Association for Molecular Pathology." J Mol Diagn **11**(1): 4-11.

Jorgensen, H. G., et al. (2007). "Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells." <u>Blood</u> **109**(9): 4016-4019.

Kalmanti, L., et al. (2015). "Safety and efficacy of imatinib in CML over a period of 10 years: data from the randomized CML-study IV." <u>Leukemia</u> **29**(5): 1123-1132.

Kang, Z. J., et al. (2016). "The Philadelphia chromosome in leukemogenesis." Chin J Cancer 35: 48.

Kantarjian, H., et al. (2002). "Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia." <u>N Engl J Med</u> **346**(9): 645-652.

Kantarjian, H. M., et al. (2003). "Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic responses." <u>Blood</u> **101**(1): 97-100.

Kantarjian, H. M., et al. (1993). "Chronic myelogenous leukemia: a concise update." <u>Blood</u> 82(3): 691-703.

Kantarjian, H. M., et al. (1990). "Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia and chronic myelomonocytic leukemia." <u>Hematol Oncol Clin North Am</u> **4**(2): 389-404.

Kantarjian, H. M., et al. (1995). "Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy. The Leukemia Service." <u>Ann Intern Med</u> **122**(4): 254-261.

Kasikci, E., et al. (2020). "Repurposing of Alexidine Dihydrochloride as an Apoptosis Initiator and Cell Cycle Inhibitor in Human Pancreatic Cancer." <u>Anticancer Agents Med Chem</u> **20**(16): 1956-1965.

Katayama, Y., et al. (2006). "Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow." <u>Cell</u> **124**(2): 407-421.

Kaur, S., et al. (2005). "Role of protein kinase C-delta (PKC-delta) in the generation of the effects of IFNalpha in chronic myelogenous leukemia cells." <u>Experimental hematology</u> **33**(5): 550-557.

Kelliher, M. A., et al. (1990). "Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **87**(17): 6649-6653.

Khorashad, J. S., et al. (2006). "The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib." <u>Leukemia</u> **20**(4): 658-663.

Khorashad, J. S., et al. (2013). "BCR-ABL1 compound mutations in tyrosine kinase inhibitor-resistant CML: frequency and clonal relationships." <u>Blood</u> **121**(3): 489-498.

Kiel, M. J. and S. J. Morrison (2008). "Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells." <u>Nat Rev Immunol</u> **8**(4): 290-301.

Kiel, M. J., et al. (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." <u>Cell</u> **121**(7): 1109-1121.

Kim, J. A., et al. (2015). "Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia." <u>Cancer Res</u> **75**(11): 2222-2231.

Kim, Y., et al. (2015). "Genetic and epigenetic alterations of bone marrow stromal cells in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients." <u>Stem Cell Res</u> **14**(2): 177-184.

Kin, Y., et al. (2001). "Inhibition of protein kinase C delta has negative effect on anchorage-independent growth of BCR-ABL-transformed Rat1 cells." <u>Leukemia research</u> **25**(9): 821-825.

Kin, Y., et al. (2001). "Inhibition of protein kinase C delta has negative effect on anchorage-independent growth of BCR-ABL-transformed Rat1 cells." <u>Leuk Res</u> **25**(9): 821-825.

Kobune, M., et al. (2009). "Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells." <u>Cancer Sci</u> **100**(5): 948-955.

Konig, H., et al. (2008). "Effective and selective inhibition of chronic myeloid leukemia primitive hematopoietic progenitors by the dual Src/Abl kinase inhibitor SKI-606." <u>Blood</u> **111**(4): 2329-2338.

Kopp, H. G., et al. (2005). "The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization." <u>Physiology (Bethesda)</u> **20**: 349-356.

Korfi, K., et al. (2015). "A personalised medicine approach for ponatinib-resistant chronic myeloid leukaemia." <u>Ann Oncol **26**(6): 1180-1187</u>.

Krause, D. S., et al. (2006). "Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells." <u>Nat Med</u> **12**(10): 1175-1180.

Kreso, A., et al. (2014). "Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer." <u>Nat Med</u> **20**(1): 29-36.

Kruiswijk, F., et al. (2015). "p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **16**(7): 393-405.

Kuepper, M. K., et al. (2019). "Stem cell persistence in CML is mediated by extrinsically activated JAK1-STAT3 signaling." Leukemia **33**(8): 1964-1977.

Kuntz, E. M., et al. (2017). "Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells." <u>Nat Med</u> **23**(10): 1234-1240.

Kurzrock, R., et al. (1990). "Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement: a chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course." <u>Blood</u> **75**(2): 445-452.

Lagadinou, E. D., et al. (2013). "BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells." <u>Cell Stem Cell</u> **12**(3): 329-341.

Lapidot, T., et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." <u>Nature</u> **367**(6464): 645-648.

Laugesen, A. and K. Helin (2014). "Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer." <u>Cell Stem Cell</u> **14**(6): 735-751.

Laurenti, E. and B. Gottgens (2018). "From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes." <u>Nature</u> **553**(7689): 418-426.

Lee, P. C., et al. (2018). "Targeting PKCdelta as a Therapeutic Strategy against Heterogeneous Mechanisms of EGFR Inhibitor Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer." <u>Cancer Cell</u> **34**(6): 954-969 e954.

Lessard, J. and G. Sauvageau (2003). "Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells." <u>Nature</u> **423**(6937): 255-260.

Li, C., et al. (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." <u>Cancer Res</u> 67(3): 1030-1037.

Li, S. (2008). "Src-family kinases in the development and therapy of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia." <u>Leuk Lymphoma</u> **49**(1): 19-26.

Li, S., et al. (2019). "Cyclin G2 Inhibits the Warburg Effect and Tumour Progression by Suppressing LDHA Phosphorylation in Glioma." Int J Biol Sci **15**(3): 544-555.

Li, W. J., et al. (2013). "CCNG2 suppressor biological effects on thyroid cancer cell through promotion of CDK2 degradation." <u>Asian Pac J Cancer Prev</u> **14**(10): 6165-6171.

Li, Z., et al. (2006). "Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex." J Biol Chem **281**(29): 20643-20649.

Lichtman, M. A. (2010). "Obesity and the risk for a hematological malignancy: leukemia, lymphoma, or myeloma." <u>Oncologist</u> **15**(10): 1083-1101.

Liu, J., et al. (2009). "Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway." <u>Nature</u> **459**(7245): 387-392.

Liu, Y. and N. S. Gray (2006). "Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations." <u>Nat Chem Biol</u> **2**(7): 358-364.

Liu, Y., et al. (2012). "Akt phosphorylates the transcriptional repressor bmi1 to block its effects on the tumor-suppressing ink4a-arf locus." <u>Sci Signal</u> **5**(247): ra77.

Lombardo, L. J., et al. (2004). "Discovery of N-(2-chloro-6-methyl- phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4- ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays." J Med Chem **47**(27): 6658-6661.

Losson, H., et al. (2020). "HDAC6-an Emerging Target Against Chronic Myeloid Leukemia?" <u>Cancers</u> (Basel) **12**(2).

Lu, L., et al. (2015). "Ponatinib is not transported by ABCB1, ABCG2 or OCT-1 in CML cells." <u>Leukemia</u> **29**(8): 1792-1794.

Maertens, G. N., et al. (2009). "Several distinct polycomb complexes regulate and co-localize on the INK4a tumor suppressor locus." <u>PLoS One</u> **4**(7): e6380.

Magnon, C., et al. (2013). "Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression." <u>Science</u> **341**(6142): 1236361.

Mahon, F. X., et al. (2000). "Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance." <u>Blood</u> **96**(3): 1070-1079.

Malmberg, E. K., et al. (2004). "Bcr (breakpoint cluster region) protein binds to PDZ-domains of scaffold protein PDZK1 and vesicle coat protein Mint3." <u>J Cell Sci</u> **117**(Pt 23): 5535-5541.

Manley, P. W., et al. (2004). "Urea derivatives of STI571 as inhibitors of Bcr-Abl and PDGFR kinases." <u>Bioorg Med Chem Lett</u> **14**(23): 5793-5797.

Mantel, C. R., et al. (2015). "Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock." <u>Cell</u> **161**(7): 1553-1565.

Marin, D., et al. (2010). "Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib." <u>J Clin Oncol</u> **28**(14): 2381-2388.

Martiat, P., et al. (1991). "Philadelphia-negative (Ph-) chronic myeloid leukemia (CML): comparison with Ph+ CML and chronic myelomonocytic leukemia. The Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique." <u>Blood</u> **78**(1): 205-211.

Martin, A. and A. Cano (2010). "Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal." <u>Nat Cell Biol</u> **12**(10): 924-925.

Martinez-Outschoorn, U. E., et al. (2017). "Cancer metabolism: a therapeutic perspective." <u>Nat Rev Clin</u> <u>Oncol</u> **14**(1): 11-31.

Martini, M., et al. (2013). "Targeting PI3K in Cancer: Any Good News?" <u>Front Oncol</u> **3**: 108.

Masure, S., et al. (1999). "Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3." <u>Eur J Biochem</u> **265**(1): 353-360.

Matsunaga, T., et al. (2003). "Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia." <u>Nat Med</u> **9**(9): 1158-1165.

Melo, J. V. (1996). "The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype." <u>Blood</u> **88**(7): 2375-2384.

Melo, J. V. (1997). "BCR-ABL gene variants." <u>Baillieres Clin Haematol</u> 10(2): 203-222.

Melo, J. V. and C. Chuah (2007). "Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia." <u>Cancer Lett</u> **249**(2): 121-132.

Meloni, G., et al. (2001). "Obesity and autologous stem cell transplantation in acute myeloid leukemia." <u>Bone Marrow Transplant</u> **28**(4): 365-367.

Mendez-Ferrer, S., et al. (2020). "Bone marrow niches in haematological malignancies." <u>Nat Rev Cancer</u> **20**(5): 285-298.

Mileykovskaya, E., et al. (2005). "Cardiolipin in energy transducing membranes." <u>Biochemistry (Mosc)</u> **70**(2): 154-158.

Milojkovic, D. and J. Apperley (2009). "Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia." <u>Clin Cancer Res</u> **15**(24): 7519-7527.

Mohty, M., et al. (2007). "The polycomb group BMI1 gene is a molecular marker for predicting prognosis of chronic myeloid leukemia." <u>Blood</u> **110**(1): 380-383.

Montefusco, E., et al. (1992). "Ph-negative and bcr-negative atypical chronic myelogenous leukemia: biological features and clinical outcome." <u>Ann Hematol</u> **65**(1): 17-21.

Mourgues, L., et al. (2015). "The BMI1 polycomb protein represses cyclin G2-induced autophagy to support proliferation in chronic myeloid leukemia cells." <u>Leukemia</u> **29**(10): 1993-2002.

Muller, M. C., et al. (2009). "Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations." <u>Blood</u> **114**(24): 4944-4953.

Muselli, F., et al. (2019). "Druggable Biochemical Pathways and Potential Therapeutic Alternatives to Target Leukemic Stem Cells and Eliminate the Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia." <u>Int J Mol</u> <u>Sci</u> **20**(22).

Nakamura, S., et al. (2012). "Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells." <u>PLoS One</u> **7**(5): e36209.

Nalefski, E. A. and A. C. Newton (2001). "Membrane binding kinetics of protein kinase C betall mediated by the C2 domain." <u>Biochemistry</u> **40**(44): 13216-13229.

Nam, S., et al. (2007). "Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells." <u>Mol Cancer Ther</u> **6**(4): 1400-1405.

Nan, Y., et al. (2017). "Interplay between Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Activated by Type I Interferons and Viral Antagonism." <u>Front Immunol</u> **8**: 1758.

Nanos-Webb, A., et al. (2016). "PKCiota promotes ovarian tumor progression through deregulation of cyclin E." <u>Oncogene</u> **35**(19): 2428-2440.

Nardinelli, L., et al. (2012). "Pretherapeutic expression of the hOCT1 gene predicts a complete molecular response to imatinib mesylate in chronic-phase chronic myeloid leukemia." <u>Acta Haematol</u> **127**(4): 228-234.

Nath, A. K., et al. (2015). "PTPMT1 Inhibition Lowers Glucose through Succinate Dehydrogenase Phosphorylation." <u>Cell Rep</u> **10**(5): 694-701.

Naveiras, O., et al. (2009). "Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment." <u>Nature</u> **460**(7252): 259-263.

Nervi, B., et al. (2009). "Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100." <u>Blood</u> **113**(24): 6206-6214.

Ni, L. N., et al. (2011). "Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia." <u>Med Oncol</u> **28**(1): 265-269.

Nishizuka, Y. (1995). "Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses." <u>FASEB J</u> **9**(7): 484-496.

Nowak, K., et al. (2006). "BMI1 is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas." <u>Nucleic Acids Res</u> **34**(6): 1745-1754.

Nowell, P. C. (1962). "The minute chromosome (Phl) in chronic granulocytic leukemia." <u>Blut</u> 8: 65-66.

O'Brian, C. A., et al. (1989). "Level of protein kinase C activity correlates directly with resistance to adriamycin in murine fibrosarcoma cells." <u>FEBS Lett</u> **246**(1-2): 78-82.

O'Brien, C. A., et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." <u>Nature</u> **445**(7123): 106-110.

O'Brien, S. G., et al. (2003). "Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia." <u>N Engl J Med</u> **348**(11): 994-1004.

O'Dwyer, M. E. and B. J. Druker (2000). "STI571: an inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase for the treatment of chronic myelogenous leukaemia." <u>Lancet Oncol</u> **1**: 207-211.

O'Hare, T., et al. (2009). "AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance." <u>Cancer Cell</u> **16**(5): 401-412.

O'Hare, T., et al. (2005). "In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants." <u>Cancer Res</u> **65**(11): 4500-4505.

O'Hare, T., et al. (2012). "Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia." <u>Nat Rev</u> <u>Cancer</u> **12**(8): 513-526.

O'Shea, J. J. and P. J. Murray (2008). "Cytokine signaling modules in inflammatory responses." Immunity **28**(4): 477-487.

Omatsu, Y., et al. (2010). "The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche." <u>Immunity</u> **33**(3): 387-399.

Ouchi, N., et al. (2011). "Adipokines in inflammation and metabolic disease." <u>Nat Rev Immunol</u> **11**(2): 85-97.

Pane, F., et al. (2002). "BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations." <u>Oncogene</u> **21**(56): 8652-8667.

Papayannopoulou, T. and D. T. Scadden (2008). "Stem-cell ecology and stem cells in motion." <u>Blood</u> **111**(8): 3923-3930.

Park, I. K., et al. (2003). "Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells." <u>Nature</u> **423**(6937): 302-305.

Parker, W. T., et al. (2012). "Poor response to second-line kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients with multiple low-level mutations, irrespective of their resistance profile." <u>Blood</u> **119**(10): 2234-2238.

Pendergast, A. M., et al. (1991). "BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner." <u>Cell</u> **66**(1): 161-171.

Pendergast, A. M., et al. (1993). "BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein." <u>Cell</u> **75**(1): 175-185.

Pfirrmann, M., et al. (2016). "Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia." <u>Leukemia</u> **30**(1): 48-56.

Picard, S., et al. (2007). "Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia." <u>Blood</u> **109**(8): 3496-3499.

Pinho, S. and P. S. Frenette (2019). "Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **20**(5): 303-320.

Pitt, L. A., et al. (2015). "CXCL12-Producing Vascular Endothelial Niches Control Acute T Cell Leukemia Maintenance." <u>Cancer Cell</u> **27**(6): 755-768.

Prost, S., et al. (2015). "Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPARgamma agonists." <u>Nature</u> **525**(7569): 380-383.

Puttini, M., et al. (2006). "In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells." <u>Cancer Res</u> **66**(23): 11314-11322.

Qi, X., et al. (2014). "MicroRNA-320a inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting BMI-1 in nasopharyngeal carcinoma." <u>FEBS Lett</u> **588**(20): 3732-3738.

Quintas-Cardama, A. and J. Cortes (2009). "Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia." <u>Blood</u> **113**(8): 1619-1630.

Radich, J., et al. (1997). "Detection of bcr-abl transcripts in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia after marrow transplantation." <u>Blood</u> **89**(7): 2602-2609.

Radich, J. P., et al. (2006). "Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **103**(8): 2794-2799.

Reckel, S., et al. (2017). "Differential signaling networks of Bcr-Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics." <u>Leukemia</u> **31**(7): 1502-1512.

Redaelli, S., et al. (2009). "Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants." J Clin Oncol **27**(3): 469-471.

Remsing Rix, L. L., et al. (2009). "Global target profile of the kinase inhibitor bosutinib in primary chronic myeloid leukemia cells." <u>Leukemia</u> **23**(3): 477-485.

Riether, C., et al. (2015). "Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system." <u>Cell Death Differ</u> **22**(2): 187-198.

Ringshausen, I., et al. (2002). "Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta." <u>Blood</u> **100**(10): 3741-3748.

Rix, U., et al. (2007). "Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets." <u>Blood</u> **110**(12): 4055-4063.

Rizo, A., et al. (2010). "BMI1 collaborates with BCR-ABL in leukemic transformation of human CD34+ cells." <u>Blood</u> **116**(22): 4621-4630.

Roche-Lestienne, C., et al. (2002). "Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment." <u>Blood</u> **100**(3): 1014-1018.

Rosilio, C., et al. (2014). "Metformin: a metabolic disruptor and anti-diabetic drug to target human leukemia." <u>Cancer letters</u> **346**(2): 188-196.

Rothermund, C. A., et al. (2005). "Casodex treatment induces hypoxia-related gene expression in the LNCaP prostate cancer progression model." <u>BMC Urol</u> **5**: 5.

Rowley, J. D. (1973). "Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." <u>Nature</u> **243**(5405): 290-293.

Sahasrabuddhe, A. A., et al. (2011). "betaTrCP regulates BMI1 protein turnover via ubiquitination and degradation." <u>Cell Cycle</u> **10**(8): 1322-1330.

Sanchez-Beato, M., et al. (2006). "Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays." <u>Mod Pathol</u> **19**(5): 684-694.

Saudy, N. S., et al. (2014). "BMI1 gene expression in myeloid leukemias and its impact on prognosis." <u>Blood Cells Mol Dis</u> **53**(4): 194-198.

Schepers, K., et al. (2013). "Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche." <u>Cell Stem Cell</u> **13**(3): 285-299.

Schindler, C. and C. Plumlee (2008). "Inteferons pen the JAK-STAT pathway." <u>Semin Cell Dev Biol</u> **19**(4): 311-318.

Schindler, T., et al. (2000). "Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase." <u>Science</u> **289**(5486): 1938-1942.

Sen, R., et al. (2012). "The novel BCR-ABL and FLT3 inhibitor ponatinib is a potent inhibitor of the MDRassociated ATP-binding cassette transporter ABCG2." <u>Mol Cancer Ther</u> **11**(9): 2033-2044.

Sengupta, A., et al. (2012). "Bmi1 reprograms CML B-lymphoid progenitors to become B-ALL-initiating cells." <u>Blood</u> **119**(2): 494-502.

Shah, N. P. and C. L. Sawyers (2003). "Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosomeassociated leukemias." <u>Oncogene</u> **22**(47): 7389-7395.

Shah, N. P., et al. (2007). "Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency." J Clin Invest **117**(9): 2562-2569.

Shah, N. P., et al. (2004). "Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor." <u>Science</u> **305**(5682): 399-401.

Sharif, T. R. and M. Sharif (1999). "Overexpression of protein kinase C epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples." Int J Oncol **15**(2): 237-243.

Siddique, H. R., et al. (2013). "BMI1, stem cell factor acting as novel serum-biomarker for Caucasian and African-American prostate cancer." <u>PLoS One</u> **8**(1): e52993.

Simon, J. A. and R. E. Kingston (2009). "Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **10**(10): 697-708.

Singh, S. K., et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." <u>Nature</u> **432**(7015): 396-401.

Sokal, J. E., et al. (1984). "Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia." <u>Blood</u> **63**(4): 789-799.

Song, S. J., et al. (2013). "MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling." <u>Cell</u> **154**(2): 311-324.

Soverini, S., et al. (2005). "ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia." J Clin Oncol **23**(18): 4100-4109.

Sriskanthadevan, S., et al. (2015). "AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress." <u>Blood</u> **125**(13): 2120-2130.

Strehlow, I. and C. Schindler (1998). "Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation." J Biol Chem **273**(43): 28049-28056.

Sugihara, H., et al. (2013). "Identification of miR-30e\* regulation of Bmi1 expression mediated by tumor-associated macrophages in gastrointestinal cancer." <u>PLoS One</u> **8**(11): e81839.

Sun, G. G., et al. (2014). "CCNG2 expression is downregulated in colorectal carcinoma and its clinical significance." <u>Tumour Biol</u> **35**(4): 3339-3346.

Takahashi, N., et al. (2012). "Influence of H2-receptor antagonists and proton pump inhibitors on dasatinib pharmacokinetics in Japanese leukemia patients." <u>Cancer Chemother Pharmacol</u> **69**(4): 999-1004.

Takashima, A., et al. (2014). "Protein kinase Cdelta is a therapeutic target in malignant melanoma with NRAS mutation." <u>ACS Chem Biol</u> **9**(4): 1003-1014.

Takeshita, S., et al. (2014). "Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL." J Biol Chem **289**(24): 16699-16710.

Takubo, K., et al. (2013). "Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells." <u>Cell Stem Cell</u> **12**(1): 49-61.

Tanaka, C. and Y. Nishizuka (1994). "The protein kinase C family for neuronal signaling." <u>Annu Rev</u> <u>Neurosci</u> **17**: 551-567.

Thomas, D. and R. Majeti (2016). "Burning Fat Fuels Leukemic Stem Cell Heterogeneity." <u>Cell Stem Cell</u> **19**(1): 1-2.

Thomas, J., et al. (2004). "Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance." <u>Blood</u> **104**(12): 3739-3745.

Tokarski, J. S., et al. (2006). "The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants." <u>Cancer Res</u> **66**(11): 5790-5797.

Tran, T. T. and C. R. Kahn (2010). "Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease." <u>Nat Rev Endocrinol</u> **6**(4): 195-213.

Uy, G. L., et al. (2012). "A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia." <u>Blood</u> **119**(17): 3917-3924.

Vakana, E., et al. (2011). "Antileukemic effects of AMPK activators on BCR-ABL-expressing cells." <u>Blood</u> **118**(24): 6399-6402.

Valentino, L. and J. Pierre (2006). "JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies." <u>Biochem Pharmacol</u> **71**(6): 713-721.

van Lohuizen, M., et al. (1991). "Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging." <u>Cell</u> **65**(5): 737-752.

Vander Heiden, M. G., et al. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." <u>Science</u> **324**(5930): 1029-1033.

Verstovsek, S., et al. (2002). "Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: low levels of p230 BCR/ABL mRNA and undetectable BCR/ABL protein may predict an indolent course." <u>Cancer</u> **94**(9): 2416-2425.

Vetrie, D., et al. (2020). "The leukaemia stem cell: similarities, differences and clinical prospects in CML and AML." <u>Nat Rev Cancer</u> **20**(3): 158-173.

Vissers, J. H., et al. (2012). "The emerging role of Polycomb repressors in the response to DNA damage." <u>J Cell Sci</u> **125**(Pt 17): 3939-3948.
Vlashi, E., et al. (2011). "Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> **108**(38): 16062-16067.

Voeltzel, T., et al. (2018). "A new signaling cascade linking BMP4, BMPR1A, DeltaNp73 and NANOG impacts on stem-like human cell properties and patient outcome." <u>Cell Death Dis</u> **9**(10): 1011.

von der Heide, E. K., et al. (2017). "Molecular alterations in bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia patients." <u>Leukemia</u> **31**(5): 1069-1078.

Wang, D., et al. (2020). "Cyclin G2 Inhibits Oral Squamous Cell Carcinoma Growth and Metastasis by Binding to IGFBP3 and Regulating the FAK-SRC-STAT Signaling Pathway." <u>Front Oncol</u> **10**: 560572.

Wang, H. B., et al. (2013). "Sp1 and c-Myc regulate transcription of BMI1 in nasopharyngeal carcinoma." <u>FEBS J</u> **280**(12): 2929-2944.

Wang, J. Y. (2014). "The capable ABL: what is its biological function?" Mol Cell Biol **34**(7): 1188-1197.

Wang, L., et al. (2015). "Downregulated miR-495 [Corrected] Inhibits the G1-S Phase Transition by Targeting Bmi-1 in Breast Cancer." <u>Medicine (Baltimore)</u> **94**(21): e718.

Wang, Q., et al. (2017). "Pharmacological inhibition of Bmi1 by PTC-209 impaired tumor growth in head neck squamous cell carcinoma." <u>Cancer Cell Int</u> **17**: 107.

Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." <u>Science</u> **123**(3191): 309-314.

Warburg, O., et al. (1927). "The Metabolism of Tumors in the Body." J Gen Physiol 8(6): 519-530.

Warsch, W., et al. (2013). "Adding a new facet to STAT5 in CML: multitasking for leukemic cells." <u>Cell</u> <u>Cycle</u> **12**(12): 1813-1814.

Weisberg, E., et al. (2005). "Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl." <u>Cancer Cell</u> **7**(2): 129-141.

Westbrook, C. A., et al. (1992). "Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study (8762)." <u>Blood</u> **80**(12): 2983-2990.

White, D. L., et al. (2010). "Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib." J Clin Oncol **28**(16): 2761-2767.

White, D. L., et al. (2007). "Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity." <u>Blood</u> **110**(12): 4064-4072.

White, D. L., et al. (2006). "OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib." <u>Blood</u> **108**(2): 697-704.

Wiedemann, L. M., et al. (1988). "The correlation of breakpoint cluster region rearrangement and p210 phl/abl expression with morphological analysis of Ph-negative chronic myeloid leukemia and other myeloproliferative diseases." <u>Blood</u> **71**(2): 349-355.

Willis, S. G., et al. (2005). "High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinibnaive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy." <u>Blood</u> **106**(6): 2128-2137.

Wong, S. and O. N. Witte (2004). "The BCR-ABL story: bench to bedside and back." <u>Annu Rev Immunol</u> **22**: 247-306.

Wullschleger, S., et al. (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." Cell **124**(3): 471-484.

Wylie, A. A., et al. (2017). "The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR-ABL1." <u>Nature</u> **543**(7647): 733-737.

Xenaki, D., et al. (2004). "Bcr-Abl-mediated molecular mechanism for apoptotic suppression in multipotent haemopoietic cells: a role for PKCbetall." <u>Cellular signalling</u> **16**(2): 145-156.

Xenaki, D., et al. (2004). "Bcr-Abl-mediated molecular mechanism for apoptotic suppression in multipotent haemopoietic cells: a role for PKCbetall." <u>Cell Signal</u> **16**(2): 145-156.

Xiao, X., et al. (2015). "MicroRNA-93 regulates cyclin G2 expression and plays an oncogenic role in laryngeal squamous cell carcinoma." Int J Oncol **46**(1): 161-174.

Yamada, O., et al. (2011). "Activation of STAT5 confers imatinib resistance on leukemic cells through the transcription of TERT and MDR1." <u>Cell Signal</u> **23**(7): 1119-1127.

Yamazaki, S., et al. (2011). "Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche." <u>Cell</u> **147**(5): 1146-1158.

Yang, J., et al. (2007). "Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> **104**(25): 10494-10499.

Yang, J., et al. (2007). "Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> **104**(25): 10494-10499.

Yang, Z. Z., et al. (2004). "Physiological functions of protein kinase B/Akt." <u>Biochem Soc Trans</u> **32**(Pt 2): 350-354.

Yao, E. and P. T. Chuang (2015). "Hedgehog signaling: From basic research to clinical applications." J Formos Med Assoc **114**(7): 569-576.

Ye, H., et al. (2016). "Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche." <u>Cell Stem Cell</u> **19**(1): 23-37.

Yip, K. W., et al. (2006). "Potential use of alexidine dihydrochloride as an apoptosis-promoting anticancer agent." <u>Molecular cancer therapeutics</u> **5**(9): 2234-2240.

Yokota, T., et al. (2000). "Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages." <u>Blood</u> **96**(5): 1723-1732.

Yu, V. W. and D. T. Scadden (2016). "Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche." <u>Curr Top</u> <u>Dev Biol</u> **118**: 21-44. Zabriskie, M. S., et al. (2014). "BCR-ABL1 compound mutations combining key kinase domain positions confer clinical resistance to ponatinib in Ph chromosome-positive leukemia." <u>Cancer Cell</u> **26**(3): 428-442.

Zahalka, A. H., et al. (2017). "Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer." <u>Science</u> **358**(6361): 321-326.

Zeng, Z., et al. (2009). "Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML." <u>Blood</u> **113**(24): 6215-6224.

Zhang, B., et al. (2013). "Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt-beta-catenin signaling." <u>Blood</u> **121**(10): 1824-1838.

Zhang, J., et al. (2011). "Mitochondrial phosphatase PTPMT1 is essential for cardiolipin biosynthesis." <u>Cell Metab</u> **13**(6): 690-700.

Zhao, C., et al. (2009). "Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia." <u>Nature</u> **458**(7239): 776-779.

Zhao, H., et al. (2020). "Cyclin G2, a novel target of sulindac to inhibit cell cycle progression in colorectal cancer." <u>Genes & Diseases</u>.

Zhong, J. S., et al. (2012). "Correlation between imatinib trough concentration and efficacy in Chinese chronic myelocytic leukemia patients." <u>Acta Haematol</u> **127**(4): 221-227.

Zhou, B. O., et al. (2017). "Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF." <u>Nat Cell Biol</u> **19**(8): 891-903.

Zhu, G., et al. (2015). "Upregulation of miR-130b enhances stem cell-like phenotype in glioblastoma by inactivating the Hippo signaling pathway." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **465**(2): 194-199.

Zoncu, R., et al. (2011). "mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase." <u>Science</u> **334**(6056): 678-683.