



HAL
open science

Le couple CXCR4/CXCL12 dans l'hématopoïèse normale et les leucémies aiguës myéloïdes

Mallorie Mangean Dépond

► **To cite this version:**

Mallorie Mangean Dépond. Le couple CXCR4/CXCL12 dans l'hématopoïèse normale et les leucémies aiguës myéloïdes. Hématologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017US-PCC334 . tel-03710643

HAL Id: tel-03710643

<https://theses.hal.science/tel-03710643>

Submitted on 30 Jun 2022

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 de biologie l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot
Ecole doctorale Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies N°561

UMR 1170 – Hématopoïèse normale et pathologique
Gustave Roussy – Villejuif, France

Le couple CXCR4/CXCL12 dans l'hématopoïèse normale et les leucémies aiguës myéloïdes

1 – Rôle de l'axe CXCR4/CXCL12 dans la régulation du stress oxydatif des cellules souches hématopoïétiques

2 - Implication du facteur de transcription ASCL2 dans l'hématopoïèse normale et les leucémies aiguës myéloïdes

Par Mme Mallorie Mangan Dépond

Préparée et soutenue publiquement à Villejuif, le 30 octobre 2017

Président du jury : Mr François Delhommeau, Paris 6, Pr PUPH HDR

Rapporteurs : Mme Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès, Paris 11, DR HDR

Mr Frédéric Mazurier, Tours, DR HDR

Examineurs : Mme Evelyne Lauret, Paris 5, CR, HDR

Mr Fabien Guidez, Paris 7, HDR

Directrice de thèse : Mme Fawzia Louache, Paris 11, DR HDR



Except where otherwise noted, this work is licensed under <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

"Believe you can and you're halfway there."

Theodore Roosevelt

Remerciements

Se lancer dans une thèse est une décision personnelle, une aventure professionnelle, et pourtant, plus d'une personne est engagée dans ce projet. Il est donc naturel, au moment de remettre ce manuscrit, de penser à celles et ceux qui y ont contribué.

Un grand merci aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse. Je remercie Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès et Frédéric Mazurier d'avoir accepté d'être rapporteurs. Merci également à Evelyne Lauret et Fabien Guidez d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je remercie également François Delhommeau d'avoir accepté de présider mon jury.

Je remercie Fawzia Louache de m'avoir accueillie et encadrée ainsi que pour la confiance que tu m'as accordée durant quatre ans au sein de ton équipe. Dans cette équipe je tiens à en remercier chaque membre en commençant par les chercheurs Yanyan Zhang, Monika Wittner et Virginie Joulin. En particulier Yanyan, tu m'as formée et aidée avec bienveillance, je t'en suis très reconnaissante. Je tiens particulièrement à remercier mon collègue thésard et ami Liang He, merci pour ton amitié, ton soutien, ta gentillesse et ton humour pétillant. Ce fut un plaisir de partager trois années de thèse avec toi. Ensuite je remercie les techniciennes, Aline Betems qui m'a formé sur les manipulations de souris, l'élevage, le tatouage et Viviane Baral, un peu du soleil de la Martinique chaque matin, qui m'a largement aidé avec les préparations de prélèvements de sang, la biologie moléculaire et les génotypages. Une pensée particulière pour Florian Beghi, de stagiaire il est devenu un collègue sur lequel j'ai pu compter en fin de thèse pour prendre le relais avec nos petites souris.

Notre unité 1009, devenue 1170, s'étend bien au-delà de notre petite équipe et nombreux sont ceux qui méritent d'être remerciés autant professionnellement que personnellement. En particulier, je tiens à remercier ma voisine Stefania pour sa bonne humeur et sa détermination, Emilie pour sa douceur et ses conseils pertinents, Delphine pour son dynamisme, Séverine pour sa jovialité et son rire. Beaucoup d'autres méritent mes sincères remerciements et amitiés : Mira, Dominika, Paule, Rahma, Catherine, Marie, Virginie, Alessandro, Maira, Nathalie, Cyriane, Véro, Nadia, Cécile, Laure, Hussein, Julie, encore une Cécile... J'en oublie sûrement tout plein et même dans les unités voisines : Awatef, Marine, sur les plateformes : Yann, Philippe, Mirile, Laure... J'ai même eu la chance d'avoir un soutien professionnel en dehors de l'IGR, je pense notamment à Olivier Albagli dont les conseils m'ont été si précieux et l'aide si nécessaire, un énorme merci. J'ai eu la chance de côtoyer de futurs scientifiques et d'apprendre à en encadrer certains, un clin d'œil aux stagiaires Suella, Anne-Laure, Erika, Camille, Grégory, Hannah, Anaïs, Ewa, Jordan. Il manque beaucoup de noms à cette liste, j'en suis désolée, je vous remerciais de vive voix dès que possible.

Chaque thésard, ancien ou futur, peut comprendre à quel point avoir le soutien de ses proches est primordial au cours de cette aventure intense. Dans mon cas, mes premières pensées vont à ma maman chérie, derrière qui je vois l'ombre de mon formidable grand-père. Forte et aimante, tu es l'un des piliers essentiels à ma vie. Ensuite mon frère, qui vit sa propre aventure de thèse, peut-être plus relax que la mienne, néanmoins tu as su te montrer persévérant. J'admire ta constance mon petit informaticien-chaenvrier ! Je remercie mon père et mes beaux-parents pour leur soutien et surtout Zabou pour m'avoir épargnée de nombreuses heures de bus-tram-bus et ainsi préserver quelques minutes de sommeil chaque matin. A la fin de la thèse, ses minutes peuvent sûrement se compter en jours ! Je remercie mes amis, mes 3 indétronables copines Marjorie, Marie et Annabelle, Bruno ami et scientifique : super combo, les Gcell de Poitiers, les nouveaux amis Sébastien, Alex, Djo & Pauline, Jacques & Gaëlle, David & Gabye, Marine, Aurélie, Guillaume, Mikado, que l'on rencontre grâce à la plus belle des rencontres : Robin. J'ai gardé le meilleur pour la fin, mon mari, mon Robin. Le coach, le bœuf qui conduit la charrue, mon chauffeur de Rolls, l'amour de ma vie. Depuis le tout début de ce projet tu es le soutien le plus essentiel, le support le plus important, le pilier qui me porte et me pousse vers l'aboutissement de ce projet. La thèse fut l'une de nos aventures, comme le Japon, la Norvège ou notre boule de poils. De nouvelles aventures passionnantes nous attendent dans les années à venir. Je suis heureuse à l'idée de les partager avec toi. Je t'aime.

Liste des abréviations

5-FU 5 Fluoro-Uracil

AA Acide Aminé

AGM Aorte-Gonade-Mésonephros

ALDH Aldéhyde déshydrogénase

ALL Acute Lymphocytic Leukemia

AML Acute Myeloid Leukemia

ARE Antioxydative Responsive Elements

ARN Acide Ribo-Nucléique

ARNT aryl hydrocarbure récepteur nucléaire Translocator

ASCL2 Achaete-Scute complex Like 2

ATRA Acide Tout-Trans Rétinoïque

BFU Burst Forming Unit

BHLH basic Helix-Loop-Helix

BMP Bone Morphogenetic Proteins

BRET Bioluminescence Resonance Energy Transfer

BSO Buthionine Sulfoximine

CAR CXCL12-Abundant Reticular Cells

CBF Core Binding Factor

CD Cluster de Differentiation

CEL Cell Expression by Linear amplification

CFU Colony Forming Unit

CLEC2 protein C-type lectin-like receptor 2

CLOUD Continuum Of Low-Primed Undifferentiated HSPC

CLP Common Lymphoid Progenitor

CMP Common Myeloid Progenitor

CSF Colony-Stimulating Factors

CSH Cellules Souche Hématopoïétique

CSL Cellules Souche Leucémique

CSM Cellules Souche Mésoenchymateuse

CSPH Cellules Souche et Progéniteur Hématopoïétique

CXCL-12 CXC-Ligand-12

CXCR4 CXC-Receptor Type 4

DCF-DA 2,7-Dichlorofluorescine Diacétate

DHH Desert Hedgehog

DNA DesoxyriboNucleic Acid

EKLF Erythroid Krüppel-like Factor

ELL Eleven-Nineteen Lysine-Rich Leukemia

ELN European Leukemia Net

ENL Eleven-Nineteen Leukemia

EPO Erythropoïétine

EPOR Erythropoïétine Récepteur

FAB Franco-Americano-Britannique

FADD Fas-associated Death Domain

FISH Fluorescence In-Situ Hybridization
 FOXO Forkhead homeobox type O
 FT Facteur de Transcription

G-CSF Granulocytic Colony-Stimulating Factor
 GFP Green Fluorescence Protein
 GMP Granulocytic-Myeloid Progenitor
 GRG Groucho-Gene Related
 GSH glutathion réduit

HASAP Human Achaete Scute Associated Protein
 HH HedgeHog
 HIF Hypoxia Induced Factor
 HOX Homeobox
 HRE Hypoxia Responsive Elements
 HSC Hematopoietic Stem Cells
 HSPC Hematopoietic And Progenitor Stem Cells
 HTRX human trithorax

IDH isocitrate déhydrogénases
 IHH Indian Hedgehog
 IL Interleukine
 ITD Internal Tandem Duplication

JAK Janus Kinase
 JNK c-jun Aminoterminal Kinase

KO Knock-Out
 KRAB Krüppel-associated box repressor domain

LAL Leucémie Aiguë Lymphoblastique
 LAM Leucémie Aiguë Myéloïde
 LEF Lymphoid Enhancer Factor
 LLC Leucémie Lymphoblastique Chronique
 LMC Leucémie Myéloïde Chronique
 LSC Leukemic Stem Cells
 LSK Lineage Negative/Sca-1 positive/Kit Positive Cells
 LT Long-term

MAPK Mitogen-activated protein Kinase
 MARS Automated Massively Parallel RNA Single-Cell Sequencing
 M-CSF Monocytic Colony-Stimulating Factor
 MEC Matrice Extra-Cellulaire
 MEP Megacaryocytic-Erythroid Progenitor
 MIF Macrophage Migration Inhibitory Factor
 MLL Mixed Lineage Leukemia
 MO Moelle Osseuse
 MPP Multi Potent Progenitor

NAC N-acétyl-L-cystéine
 NADPH Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
 NGS New Generation Sequencing

NK Natural Killer
NOD-SCID Non-Obese Diabetic Severe Combined ImmunoDeficiency
NOX NADPH oxydase

OMS Organisation Mondiale de la Santé
PML Promyelocytic Leukemia
PTEN Phosphatase and Tensin Homologue
PTH Parathyroïde Hormone
PX Phox Homology

qRT-PCR Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RAR facteur de transcription activé par l'acide rétinoïque
RNA RiboNucleic Acid
ROS Reactive Oxygen Species
RXR Récepteur X Rétinoïde

SCF Stem Cell Factor
SCL Stem Cell Leukemia Protein
SDF-1 Stromal-derived factor-1
SHH Sonic HedgeHog
SHIP SH2 Domain Containing Inositol Phosphatase-1
SIDA Syndrome d'immunoDéficiency Acquis
SMART Switching Mechanism At the end of the 5'-end of the RNA Transcript sequencing
SMD Syndrome MyéloDysplasique
SNO spindle-shaped N-cadhérine+ CD45- Osteoblast
SOD SuperOxyde Dismutase
SOS Son Of Sevenless
STRT Single-cell Tagged Reverse Transcription Sequencing

TAL T-Cell Lymphocytic Leukemia Protein
TCF T cell factor
TF Transcription Factor
TGF Transforming Growth Factor
TK Tyrosine Kinase
TNF Tumor Necrosis Factor
TPA 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TPO Thrombopoïétine
TRADD Tumor Necrosis Factor Receptor -Associated Death Domain

VHL von Hippel-Lindau
VIH Virus de l'Immunodéficiency Humaine
VLA Very Late Antigen

WT Wild-Type

Table des matières

REMERCIEMENTS	IV
LISTE DES ABREVIATIONS.....	VI
TABLE DES FIGURES	XII
RESUME	XIV
ABSTRACT	XV
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : HEMATOPOÏESE NORMALE	1
1. <i>Ontogénie du système hématopoïétique</i>	<i>1</i>
2. <i>Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).....</i>	<i>2</i>
a) Historique	2
b) Caractérisation phénotypique des CSH.....	4
3. <i>Différenciation hématopoïétique</i>	<i>6</i>
a) Modèle stochastique	7
b) Modèle du déterminisme	7
4. <i>Les cytokines et facteurs de croissance.....</i>	<i>7</i>
5. <i>Tests phénotypiques.....</i>	<i>9</i>
6. <i>Identification du destin hématopoïétique à l'échelle unicellulaire</i>	<i>11</i>
CHAPITRE 2 : NICHES / MICROENVIRONNEMENT(S)	15
1. <i>Organisation fonctionnelle du stroma</i>	<i>15</i>
2. <i>Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)</i>	<i>16</i>
3. <i>Cellules dérivées des CSM</i>	<i>17</i>
4. <i>Cellules endothéliales.....</i>	<i>20</i>
5. <i>Régulation des CSH par les cellules hématopoïétiques matures.....</i>	<i>22</i>
6. <i>La matrice extracellulaire (MEC).....</i>	<i>23</i>
7. <i>Le système nerveux sympathique.....</i>	<i>23</i>
8. <i>Les interactions entre hématopoïèse et stroma</i>	<i>24</i>
9. <i>Une, deux ou de multiples niches ?.....</i>	<i>24</i>
CHAPITRE 3 : LEUCEMIE AIGÜE MYELOÏDE ET CELLULES SOUCHES LEUCEMIQUES	27
1. <i>Définition des leucémies aiguës myéloïdes (LAM).....</i>	<i>27</i>
2. <i>Caractérisation cytogénétique et moléculaire des LAM</i>	<i>28</i>
Cas spécifique de MLL.....	30
3. <i>Les cellules souches leucémiques.....</i>	<i>31</i>
a) Concept de cellules souches leucémiques	31
b) Les CSL en quiescence	32
c) Caractérisation phénotypique des CSL	32
d) Métabolisme des CSL.....	33
4. <i>Concept de cellules pré-leucémiques.....</i>	<i>34</i>
5. <i>Interactions des CSL avec la niche hématopoïétique.....</i>	<i>35</i>
CHAPITRE 4 : DEREGULATION DES VOIES DE SIGNALISATION DE L'HEMATOPOÏESE	37
1. <i>Voies de signalisation impliquées dans la survie.....</i>	<i>37</i>
a) Wnt.....	37
b) PI3K/AKT/mTor	40
c) HedgeHog (HH)	41
d) JAK/STAT	42
e) RAS/MAPk	42
f) CXCR4/CXCL12	43
➤ CXCR4 et autres ligands	45
➤ CXCR4/MIF	45
➤ CXCR4/ubiquitine	45
➤ La dualité CXCR4 et CXCR7	46
2. <i>Voies d'apoptose.....</i>	<i>47</i>
a) Apoptose intrinsèque ou mitochondriale.....	48
b) Apoptose extrinsèque : les récepteurs de mort	49
c) Les caspases	49
d) Dérégulation des voies d'apoptose dans les LAM	49

CHAPITRE 5 : REGULATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS LES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES.....	51
1. <i>Origine des espèces réactives de l'oxygène.....</i>	51
2. <i>Régulation des ROS.....</i>	52
a) Régulation enzymatique.....	52
b) Régulation transcriptionnelle.....	54
3. <i>ROS et microenvironnement.....</i>	55
4. <i>Les ROS et CXCR4/CXCL12.....</i>	56
CHAPITRE 6 : MODULATION DES PROGRAMMES D'EXPRESSION GENIQUE PAR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE L'HEMATOPOÏESE ET DE LA LEUCEMOGENESE	59
1. <i>Facteurs de transcription à bHLH.....</i>	59
a) SCL (Tal1 et Lyl1).....	61
b) c-myc.....	61
2. <i>Autres facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse.....</i>	62
a) RUNX1.....	62
b) GATA1/GATA2.....	62
c) HOXB4.....	63
d) PU.1.....	63
e) EKLF.....	64
f) C/EBP α	64
g) RAR α	64
h) BMI1.....	65
3. <i>ASCL2, Achaete-Scute like 2.....</i>	66
a) ASCL2 chez la souris.....	66
b) ASCL2 chez l'Homme.....	67
c) Les fonctions d'ASCL2.....	68
d) L'expression d'ASCL2 est associé à un mauvais pronostic.....	70
OBJECTIFS GENERAUX DU TRAVAIL	71
ARTICLE 1 : « L'AXE CXCR4/CXCL12 S'OPPOSE A L'EPUISEMENT DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES PAR UNE PROTECTION SELECTIVE DU STRESS OXYDATIF »	72
ARTICLE 2 : « IMPLICATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION ASCL2 DANS L'HEMATOPOÏESE NORMALE ET LEUCEMIQUE »	94
DISCUSSION	120
BIBLIOGRAPHIE.....	133
ANNEXES.....	147
ARTICLE 3 EN COLLABORATION AU SEIN DE L'UNITE U1170 : « ESTABLISHMENT OF ACUTE MYELOID LEUKEMIC XENOGRAFT AS PRECLINICAL MODELS OF EPIGENETIC THERAPIES ». INTERNATIONAL JOURNAL OF HEMATOLOGY RESEARCH, 2015.....	147
ARTICLE 4 EN COLLABORATION AVEC LE LABORATOIRE DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE, CNRS UMR 8113, ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN: « A NEW HUMANIZED IN VIVO MODEL OF KIT D816V+ ADVANCED SYSTEMIC MASTOCYTOSIS MONITORED USING A SECRETED LUCIFERASE ». ONCOTARGET, 2016.....	159
POSTER SUR LE PROJET ROS PRESENTE AU CONGRES DE LA SFH 2017	177
POSTER SUR LE PROJET ASCL2 PRESENTE AU CONGRES DE LA SFH 2017	177

Table des figures

Figure 1 : Ontogénie du système hématopoïétique	2
Figure 2 : Schéma du cycle cellulaire	4
Figure 3 : Dot Plot permettant d'identifier par cytométrie en flux la side-population qui efflue le Hoechst 33342, illustration issue de (Summer et al., 2003)	5
Figure 4 : Division asymétrique des CSH. La capacité d'expansion massive des progéniteurs et leur différenciation s'accompagne de la perte de la capacité d'auto-renouvellement.	6
Figure 5 : Arbres de la hiérarchie hématopoïétique (issus de Notta (2016) et Wilson (2015))	10
Figure 6 : Les CSPH amorcent leur différenciation avec un profil d'expression de facteurs de transcription spécifique et quantitativement définis (Wilson et al. 2015)	13
Figure 7 : d'après l'analyse transcriptomique de single cell RNAseq associé à des tests fonctionnels, les CSPH forment un CLOUD-CSPH : continuum of low-primed undifferentiated HSPC (Velten et al., 2017)	14
Figure 8 : chaque cellule est un arc-en-ciel, évoluant progressivement vers un lignage défini (Hirschi, Nicoli and Walsh, 2017)	14
Figure 9 : représentation schématique montrant que les CSH sont à plus de 10 µm de l'endostéum et à moins de 5 µm des vaisseaux sinusoides selon Mendelson et Frenette (2014).	21
Figure 10 : De nombreux ligands participent aux interactions moléculaires entre les CSH et leur niche (Yue Zhang 2012)	25
Figure 11 : schéma récapitulant les différents acteurs cellulaires et moléculaires de la niche.	26
Figure 12 : diagramme du développement myéloïde normal associé aux sous-types de LAM et CSL. Adapté de Krause & Van Etten, 2007	27
Figure 13 : Classification simplifiée des LAM selon le risque cytogénétique ou moléculaire (Mis à jour selon l'OMS 2008 et Vardiman et al. 2009)	29
Figure 14 : Les interactions des cellules leucémiques avec leur microenvironnement supportent leur maintien et leur prolifération aux dépens des cellules hématopoïétiques normales (Shafat et al., 2017)	36
Figure 15 : "Hallmarks of cancers" version 2011, schéma décrivant les axes biologiques détournés par la cellule cancéreuse	37
Figure 16 : Les différentes signalisations contrôlées par Wnt.	39
Figure 17 : schématisation des voies de signalisation intracellulaires régulées par l'axe CXCR4/CXCL12 d'après B.Teicher et S.Fricker (2010)	44
Figure 18 : représentation schématique des voies modulées par CXCR4, CXCR7 ou le complexe CXCR4/CXCR7 (Asri et al., 2016).	47
Figure 19 : La voie d'apoptose mitochondriale. Le déclenchement de l'apoptose entraîne la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et le relargage du cytochrome c et la formation de l'apoptosome. Issue d'Adams, 2003.	48
Figure 20 : représentation schématique de la génération de H ₂ O ₂ et leur recyclage.	52
Figure 21 : Classification des facteurs de transcription à bHLH	60
Figure 22 : les facteurs de transcription clés du développement hématopoïétique (Orkin, 2008).	66
Figure 23 : différences connues entre les gènes et les ARN d'ASCL2 murin et humain	67
Figure 24 : représentation schématique des mécanismes d'action envisagés pour expliquer la régulation transcriptionnelle induite par ASCL2.	1277
Figure 25 : Alignement des séquences bHLH de MyoD, Tal1 et ASCL2. ASCL2 présente une absence de 3 acides aminés au centre du domaine basique de liaison à l'ADN.	1288

Résumé

De nombreuses études ont montré le rôle crucial de l'axe CXCR4/CXCL12 dans l'hématopoïèse normale et leucémique. Nous avons abordé deux thématiques de recherches en parallèle afin de mieux appréhender la biologie du récepteur CXCR4.

Tout d'abord, nous avons étudié les rôles de CXCR4/CXCL12 dans la régulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont à l'origine de l'oxydation des constituants cellulaires. Bien qu'un faible niveau de ROS soit nécessaire à la régulation de certaines voies de signalisation, à haute dose les ROS activent les voies d'apoptose, conduisent à la sénescence et à l'épuisement prématuré des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Pour cette étude, nous avons utilisé un modèle murin de reconstitution de l'hématopoïèse par des cellules de foie fœtal sauvage ou délétées constitutivement pour CXCR4. Les défauts de fonction des CSH *Cxcr4*^{-/-}, à savoir une augmentation du pourcentage des CSH apoptotiques, une augmentation de la phosphorylation de p38MAPK et des cassures d'ADN double-brins conduisent à l'épuisement des CSH. Les effets du stress oxydatif sont reversés *in vivo* par un traitement antioxydant. Nous avons également utilisé un modèle de génération de stress *in vitro* par des traitements de molécules oxydantes pour tester le potentiel antioxydant du CXCL12 et montrer que l'addition de CXCL12 réduit le stress oxydatif au niveau mitochondrial. Ces résultats montrent l'importance de l'axe CXCR4/CXCL12 dans la régulation de la longévité des CSH en limitant les effets du stress oxydatif.

De manière parallèle, nous avons étudié le rôle du facteur de transcription à bHLH ASCL2 dans l'hématopoïèse normale et leucémique. ASCL2 est impliqué dans le maintien de l'identité souche des cellules intestinales où il participe à la régulation de l'expression du récepteur de chimiokines CXCR4. En étudiant les cellules hématopoïétiques saines ainsi qu'une cohorte de patients atteints de leucémie myéloïde nous avons mis en évidence le spectre d'expression d'ASCL2 dans l'hématopoïèse et la corrélation entre la forte expression d'ASCL2 et les LAM de mauvais pronostic. Par une stratégie ShRNA dans un modèle de leucémie murine, nous avons observé que l'inhibition diminue le processus leucémique et améliore la survie des souris. Finalement, à l'aide de constructions lentivirales nous avons montré que sa surexpression dans les progéniteurs hématopoïétiques humains CD34⁺ entraîne un blocage de la différenciation et de la prolifération. Ces travaux suggèrent un rôle important de ASCL2 dans le contrôle négatif de la prolifération et de la différenciation.

Mots-clés : cellules souches hématopoïétiques ; espèces réactives de l'oxygène ; ROS ; CXCR4 ; CXCL12 ; stress oxydatif ; ASCL2 ; facteur de transcription ; bHLH ; leucémie aiguë myéloïde ;

Abstract

Many publications have shown the crucial role of the axis CXCR4/CXCL12 in the normal and leukemic hematopoiesis. We addressed in parallel two topics to better understand the biology of the CXCR4 receptor.

Firstly, we studied the roles of CXCR4/CXCL12 in the regulation of the reactive oxygen species (ROS), which are at the origin of the oxidation of the cellular constituents. Low level of ROS is necessary to regulate some signaling pathways but at high dose it activates the apoptosis pathways, leads to the senescence and to the premature exhaustion of hematopoietic stem cells (HSC). For this project, we used a murine model of hematopoietic engraftment by fetal liver cells WT or constitutively deficient CXCR4. The defects of function of the *Cxcr4*^{-/-} HSC, worth knowing an increase of the percentage of the apoptotic HSC, the increase of the p38MAPK phosphorylation and double breaks of DNA induce the exhaustion of the HSC. The effects of oxidative stress are reverted *in vivo* by an antioxidant treatment. We also used an *in vitro* model to generate stress by treatments of oxidizing molecules to test the antioxidant potential of the CXCL12 and show that CXCL12 reduces the oxidative stress at the mitochondrial level. These results highlight the importance of the CXCR4/CXCL12 axis in the regulation of lifespan of HSC by limiting oxidative stress.

Secondly, we studied the role of the bHLH transcription factor ASCL2 in the normal and leukemic hematopoiesis. It is involved in the preservation of the stem identity of the intestinal cells where it participates in the regulation of the expression of the CXCR4 receptor. By studying healthy hematopoietic cells as well as patients' cohort of myeloid leukemia, we highlighted the expression spectra of ASCL2 in the hematopoiesis and the correlation between the strong expression of ASCL2 and AML of poor prognosis. Using a shRNA strategy to silence ASCL2 in a leukemic murine model, we observed an inhibition of the leukemic development and an improved survival of the mice. Finally, by using lentiviral constructions, we were able to highlight its role in the negative control of proliferation and differentiation blocking of its overexpression in the CD34⁺ human hematopoietic progenitors. This work suggests an important role of ASCL2 in negative control of proliferation and differentiation.

Key-words: hematopoietic stem cells; reactive oxygen species; ROS; CXCR4; CXCL12; oxidative stress; ASCL2; transcription factor; bHLH; acute myeloid leukemia.

Introduction

Chapitre 1 : Hématopoïèse normale

L'hématopoïèse est le processus de fabrication de toutes les cellules qui composent le sang : les cellules myéloïdes (mastocytes, basophiles, éosinophiles, érythrocytes, plaquettes, granulocytes, monocytes et macrophages) et les cellules lymphoïdes (lymphocytes T, B et NK). Ce processus primordial a pour but de renouveler chaque jour les 100 milliards de cellules sanguines sénescents afin de maintenir les fonctions des différents compartiments de cellules sanguines. Un petit contingent de cellules, les cellules souches hématopoïétiques (CSH), assure dans la moelle osseuse (MO) la production d'un nombre suffisant de progéniteurs qui proliféreront et se différencieront pour donner les cellules matures fonctionnelles.

1. Ontogénie du système hématopoïétique

Le système hématopoïétique se développe au cours de 3 vagues de différenciation successives. Durant l'embryogénèse, il débute juste après la gastrulation quand l'hématopoïèse primitive se met en place au sein du mésoderme ventral en formant des masses de cellules accumulant l'hémoglobine fœtale qui ont été décrites pour la première fois par Florence Sabin en 1920 comme des îlots sanguins. Cette première vague fait apparaître les érythrocytes primitifs, macrophages et mégacaryocytes. Alexander Maximow en 1924 a complété la description en montrant que ces îlots sanguins se composent effectivement d'une masse centrale, que sont les cellules sanguines primitives, mais aussi d'un tissu périphérique endothélial, les premiers vaisseaux sanguins. Depuis, ces descriptions ont pu être confirmées par microscopie optique et électronique et par des techniques d'immunohistochimie. Lors de la deuxième vague, les premiers précurseurs migreront rapidement vers le sac vitellin qui est extra-embryonnaire. Toutefois, l'hématopoïèse définitive n'apparaîtra que lors de la 3ème phase au niveau de l'aorte-gonade-mésonephros (AGM), (Yoder, 2014), (Mikkola and Orkin, 2006), (Lacaud and Kouskoff, 2016) (figure 1). C'est

uniquement à partir de ce stade qu'ont été décrites les premières CSH multipotentes capables de reconstitution dans des souris irradiées. Par la suite, les CSH seront retrouvées également dans le placenta, les artères ombilicale, vitelline et crâniale, et migreront vers le foie fœtal où aura lieu une expansion massive (Costa, Kouskoff and Lacaud, 2012).

En fin de gestation, les CSH seront capables de coloniser les futurs organes sièges de l'hématopoïèse adulte qui sont la moelle osseuse (site principal), la rate et le thymus. Il est considéré que les CSH proviennent d'une amplification des CSH embryonnaires sans production *de novo*. Dans la moelle osseuse, les CSH sont principalement quiescentes.

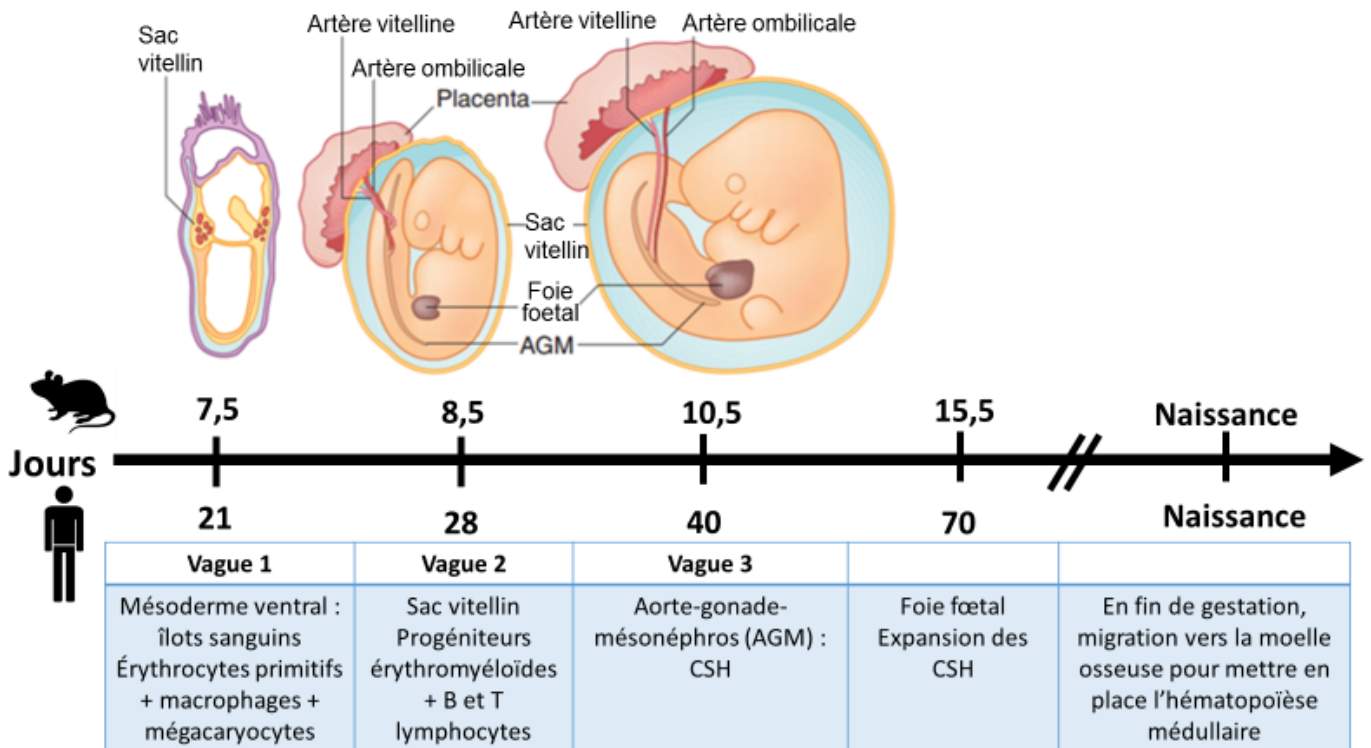


Figure 1 : Ontogénie du système hématopoïétique
Schémas représentant le développement de l'embryon et les principaux sites de production des cellules sanguines au cours du temps chez la souris et chez l'Homme au cours du temps.
Adapté de (Lacaud and Kouskoff, 2016), (Yoder, 2014), (Mikkola and Orkin, 2006).

2. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

a) Historique

Les CSH doivent être capables d'auto-renouvellement pour conserver le pool de CSH existant à la naissance, ainsi que pour maintenir toute au long de la vie la quantité appropriée de cellules sanguines matures fonctionnelles. C'est avec un vif

intérêt qu'ont débuté les recherches sur les cellules souches hématopoïétiques après les bombardements d'Hiroshima et Nagasaki en 1945. L'existence des CSH a tout d'abord été démontrée grâce à la reconstitution du système hématopoïétique par injection de moelle, dans un organisme qui avait été préalablement endommagé par irradiation. En 1961, les travaux de Till et McCulloch ont permis de quantifier précisément combien de cellules de MO d'une souris donneuse sont nécessaires pour générer des colonies myéloïdes et érythroïdes CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen) dans la rate de souris receveuses, préalablement irradiées. Le nombre de colonies observées étaient directement proportionnel au nombre de cellules injectées (Till and McCulloch, 1961).

En effet les CSH sont rares, elles ne représentent que 0,01 à 0,05% des cellules de la moelle. Pour savoir si ces colonies proviennent d'une seule cellule, ils ont irradié à faible dose la moelle de donneurs qui a provoqué des cassures des chromosomes. Les cellules qui ont pu réparer les dommages à l'ADN ont pu survivre et proliférer, mais les cassures de chromosomes ont servi de marqueurs pour chaque clone. En effet, chaque cellule d'une même colonie présentait la même marque de cassure de chromosome. Les capacités des cellules à reconstituer l'hématopoïèse et à s'autorenouveler ont permis (Becker, McCulloch and Till, 2014) de les qualifier de CSH pluripotentes.

Les CSH sont majoritairement quiescentes, on utilise également les termes de dormance ou hibernation, c'est-à-dire qu'elles sortent du cycle cellulaire et ne se divisent que très rarement (Rumman, Dhawan and Kassem, 2015). La nature quiescente des CSH a d'abord été démontré par les études de résistance des CSH à l'apoptose induite par le 5-FU (Van Zant, 1984). Puis il a été démontré chez la souris que la mise en évidence des CSH par un marquage au BrdU nécessite plus de 12 semaines d'injections *in vivo*, montrant directement l'existence de CSH avec un cycle cellulaire très lent. Les CSH en phase G0 du cycle cellulaire (figure 2), présentent un métabolisme très ralenti et surtout une capacité de reconstitution à long terme supérieure à des CSH engagées en cycle (Passegué *et al.*, 2005). En effet, l'analyse de l'expression génique réalisée à partir de CSH quiescentes et actives a montré une diminution de la transcription des ARN et un métabolisme diminué dans les CSH quiescentes (Venezia *et al.*, 2004).

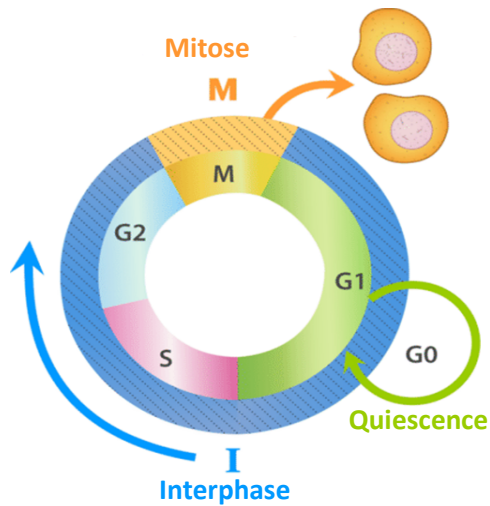


Figure 2 : Schéma du cycle cellulaire

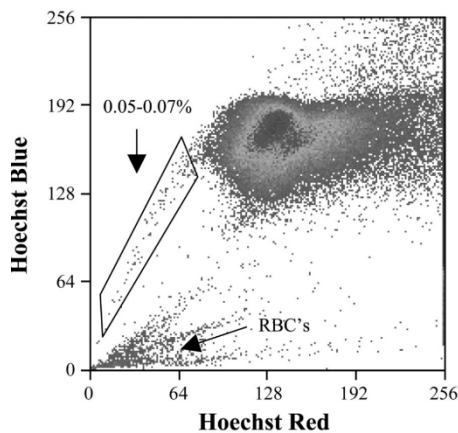
Il représente les étapes de la division cellulaire. Les CSH sont en-dehors du cycle, en phase quiescente G0.

Des travaux récents décrivent la quiescence des CSH comme un état similaire à celle de la diapause embryonnaire (Scognamiglio *et al.*, 2016) : c'est un arrêt spontané et temporaire du développement de l'embryon se produisant indépendamment des facteurs extérieurs (Méd. Biol. t.1 1970). Cet état a été majoritairement décrit dans la vie des parasites et des insectes mais c'est également un état physiologique de l'embryon fécondé de certaines espèces mammifères (souris, vison, marsupiaux) quand la mère est déjà en charge d'une portée ou d'un petit. L'embryon sortira de la diapause pour poursuivre son développement embryonnaire quand la mère aura sevré ses petits et que la situation sera plus propice au développement d'un nouvel embryon. Comme pour les cellules souches embryonnaires, les entrées et sortie de diapause des CSH pourraient être contrôlées par les protéines Myc (Laurenti *et al.*, 2008).

b) Caractérisation phénotypique des CSH

Pour pouvoir étudier des populations purifiées de CSH et leurs propriétés biologiques, l'objectif principal des travaux a été (et est toujours) de les caractériser. Le développement de la technologie de cytométrie en flux a permis d'identifier des populations cellulaires sur la base de l'expression de marqueurs phénotypiques (cluster de différenciation CD). Les CSH se distinguent des lignages matures par l'absence des marqueurs qui apparaissent au cours de la différenciation. Les CSH sont donc nommées lignage négative (Lin -). En revanche, elles expriment des marqueurs qui leur sont propres et qui disparaissent au cours de la maturation. Elles ont également été caractérisées par leur capacité à effluer

les drogues telles que le Hoechst 33342 ou la rhodamine 123 (side-population)(Goodell *et al.*, 1996) telle que illustré en figure 3.



*Figure 3 : Dot Plot permettant d'identifier par cytométrie en flux la side-population qui efflue le Hoechst 33342, illustration issue de (Summer *et al.*, 2003)*

Les opinions divergent sur la spécificité de certains marqueurs donc plusieurs combinaisons de marqueurs ont été proposées :

Exemple de combinaisons proposées pour identifier les CSH murines (Seita and Weissman, 2010) :

- Lin -, CD117 (Kit) +, Sca-1 + : cette combinaison définit la population LSK est enrichit en CSH mais qui reste une population hétérogène contenant des progéniteurs. Le Sca-1 est exprimé à différentes intensités selon la souche murine (Spangrude, Heimfeld and Weissman, 1988).
- Lin-, CD117+, Sca-1+, CD34-, flk2 (CD135 ou flt3) - (Osawa *et al.*, 1996),
- Lin-, CD117+, Sca-1+, CD48-, CD150+ (Morita, Ema and Nakauchi, 2010),
- CD45+, CD48-, CD150+, EPCR+ (CD201)(Kent *et al.*, 2009).

D'autres marqueurs ont été proposé pour distinguer les CSH ou les sous-populations de progéniteurs (exemple : CD201+, CD49b-, CD31-, CD244-, ILR7).

La même stratégie a été appliqué à l'étude des CSH humaines et a abouti aux combinaisons suivantes :

- CD34+, CD38-, Lin- (Terstappen *et al.*, 1991),
- CD34+, CD38-, Lin-, CD90+ (Craig *et al.*, 1993),
- CD34+, CD38-, Lin-, CD90+, CD45RA-, CD49f+ (Notta *et al.*, 2011) (dans cette condition seules 50% des cellules CD49f+ montrent un potentiel de reconstitution à long terme).

En laboratoire et en clinique, il est courant d'isoler une population hétérogène contenant des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques humains (CSPH) sur l'expression isolée du marqueur CD34 (Civin *et al.*, 1996).

D'autres travaux ont par ailleurs démontré que l'état de quiescence est mieux déterminé par l'état métabolique dormant des cellules que par les marqueurs phénotypiques. Grâce à une technique utilisant l'histone 2B-GFP dans un système inductible Tet-off, les CSPH incorporent l'H2B-GFP jusqu'à l'administration de doxycycline (Qiu *et al.*, 2014). Au cours de la division sous doxycycline, le marquage par H2B-GFP sera progressivement dilué. Cette technique couplée à des tests de reconstitution chez la souris et associée au marquage phénotypique des différentes fractions de CSH, ont montré qu'une fois sortie de la dormance et entrée dans un cycle de division les CSH ne peuvent pas retourner à leur état de dormance. De plus, les CSH avec le plus fort potentiel d'auto-renouvellement sont celles qui montrent le plus haut niveau d'expression de CD150 (Morita, Ema and Nakauchi, 2010).

3. Différenciation hématopoïétique

Pour produire tous les lignages matures et fonctionnels du sang, ce sont les progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques issus des CSH qui se divisent massivement et se différencient, au détriment de leur capacité d'auto-renouvellement (figure 4).

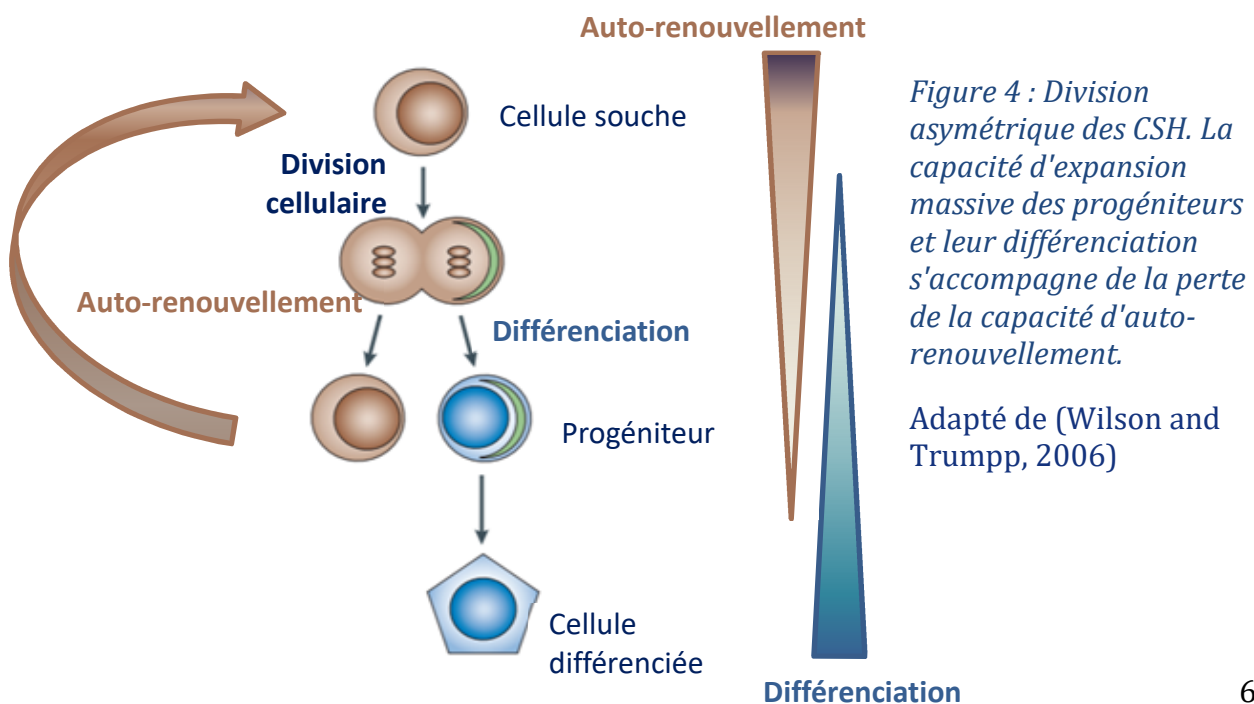


Figure 4 : Division asymétrique des CSH. La capacité d'expansion massive des progéniteurs et leur différenciation s'accompagne de la perte de la capacité d'auto-renouvellement.

Adapté de (Wilson and Trumpp, 2006)

Deux grands modèles s'opposent sur l'organisation et la hiérarchisation de la différenciation hématopoïétique.

a) Modèle stochastique

Le modèle stochastique, aussi appelé instructif, proposé par Till et al en 1964, tient compte de l'environnement car il fait l'hypothèse que les cellules progénitrices pourraient exprimer différents récepteurs des cytokines en fonction de l'environnement qu'elles rencontreront au cours de leur différenciation. Cette hypothèse laisse une part majeure au hasard et au contrôle de la différenciation par l'environnement (Brown *et al.*, 2015). D'autres travaux s'opposent à ce modèle, l'apparence stochastique serait en réalité due à une trop grande complexité pour en comprendre les réels effecteurs.

b) Modèle du déterminisme

Un long travail d'étude débute pour comprendre les mécanismes qui contrôlent la différenciation des progéniteurs et propose un modèle déterministe (Novak and Stewart, 1991). Ce modèle soutient l'hypothèse que chaque cellule a un caractère propre qui ne lui permettra finalement que de devenir ce pour quoi elle est prévue. Dans ce modèle, la cellule progénitrice, déjà engagée dans une voie de différenciation, serait régulée par les facteurs de croissance, les cytokines, les interactions cellule/microenvironnement ou cellule/cellule rencontrées. Il a été établi que les facteurs de croissance hématopoïétiques sont capables de soutenir la prolifération et la survie de toutes les étapes de différenciation de la cellule qui exprime le récepteur approprié pour ce facteur (Morrison and Weissman, 1994).

4. Les cytokines et facteurs de croissance

Dans les 2 modèles, les cytokines et facteurs de croissance jouent un rôle prépondérant dans le maintien des CSH ou dans l'orientation de la différenciation. Dans toutes les conditions de culture, la fréquence, les dépendances aux cytokines suggèrent que les progéniteurs sont des entités distinctes avec des compétences propres. Les cytokines sont sécrétées par l'environnement et parfois en dehors du système hématopoïétique. Elles forment une grande famille d'environ 60 ligands solubles extracellulaires ou membranaires qui vont se lier à leur(s) récepteur(s) pour entraîner une réponse biologique via une cascade de signalisation (Robb, 2007). Chaque cytokine peut exercer de multiples actions telles que la survie, la

prolifération, la différenciation, la migration. Les différentes branches de la famille des cytokines sont :

a) **Les colony-stimulating factors (CSF)** : ils doivent leur nom à la façon dont ils ont été découverts. Le facteur était renommé selon le type de colonies obtenues après mise en culture en milieu semi-solide des CSH ou progéniteurs avec ce « facteur stimulant ». Par exemple, le facteur qui a permis d'obtenir des colonies de type monocyte/macrophage a été nommé Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). Il y a aussi le granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (Demetri and Griffin, 1991) et le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Le G-CSF est utilisé en clinique pour mobiliser les CSH, i.e. les faire sortir les CSH de la moelle vers le sang circulant (Grigg *et al.*, 1995).

b) **Le Stem Cell Factor (SCF, anciennement Kit-ligand)** : cette cytokine joue un rôle majeur dans la MO dans la maintenance et l'auto-renouvellement des CSH via son récepteur Kit (CD117). Le SCF aurait également un rôle de chémoattractant pour que les CSH circulantes retournent dans leur niche médullaire (Czechowicz *et al.*, 2007).

c) **Les Chimiokines** : l'ensemble des cytokines ayant un pouvoir chimiotactique et dont les récepteurs sont couplés aux protéines G. On en connaît plus de 40, leur nomenclature est basée sur leur structure (CCL1 à CCL28, CXCL1 à CXCL16, XCL1 et XCL2, CX3CL1).

Le CXCL12 (Stromal-derived factor-1 SDF-1) et son récepteur canonique CXCR4 sont connus pour leur fort pouvoir chimiotactique sur les lymphocytes. L'axe CXCR4/CXCL-12 est impliqué dans le maintien et la mobilisation des CSH de la MO (Nervi, Link and DiPersio, 2006). Il y a aujourd'hui beaucoup d'évidences sur le rôle du couple dans le maintien des CSH dans la moelle mais également pour leur rôle dans le maintien de la quiescence des CSH. Les rôles et conséquences des dérégulations de l'axe CXCR4/CXCL12 seront abordés plus amplement dans le chapitre 4 « dérégulation des voies de signalisation de l'hématopoïèse ».

d) **L'érythropoïétine (EPO) et la thrombopoïétine (TPO)** : ces 2 hormones partagent 155 acides aminés (aa) homologues. L'EPO est produite par les reins et a un rôle majeur dans la prolifération et la maturation des cellules érythroïdes qui donnent les globules rouges via son récepteur EPOR. Son

utilisation est primordiale pour traiter les anémies. La TPO, principalement produite par le foie et les reins est nécessaire à la différenciation des mégacaryocytes et régule ainsi la production de plaquettes via son récepteur membranaire MPL (CD110).

e) **Le Flt3-ligand** : ce ligand du récepteur flt3 (flk2 ou CD135), qui est un récepteur à tyrosine kinase, est le seul ligand connu de son récepteur (Lyman *et al.*, 1993). C'est une cytokine essentielle pour la survie et la prolifération des CSH. Il stimule le développement lymphoïde mais une expression accrue induit une réduction du compartiment érythromégacaryocytaire (Adolfsson *et al.*, 2005).

f) **Les Interleukines (IL-)** : il s'agit de cytokines regroupées sous cette terminologie par commodité mais sans parenté. Elles ont un rôle majeur dans le système immunitaire. On compte près de 40 interleukines. Cela dit, il en existe davantage, puisqu'on compte par exemple 11 membres de la famille de l'IL-1. L'IL-3 est notamment connu pour la stimulation de prolifération de tout le lignage myéloïde.

On compte également les Interférons, la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF), les facteurs de croissance de transformation (TGF) dont le TGF- β : facteurs de croissance impliqués dans le maintien de la quiescence des CSH.

5. Tests phénotypiques

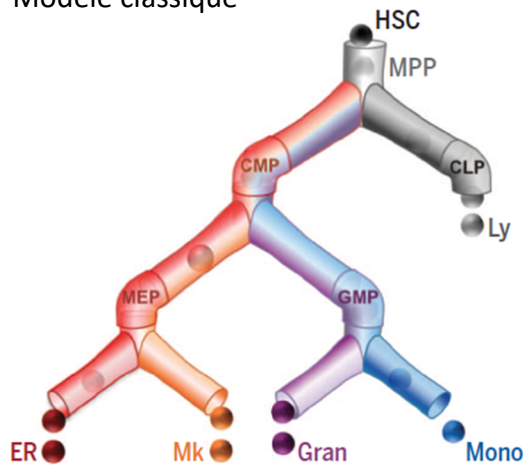
Les techniques de culture cellulaire en milieu semi-solide de méthylcellulose appelé colony forming-unit assay (CFU assay) et l'identification des cytokines ont permis de distinguer différents types de colonies permettant d'identifier *a posteriori* le type de progéniteur. Ces caractérisations phénotypiques ont conduit à compléter la nomenclature des colonies et complexifier les arbres hiérarchiques proposés jusque-là, notamment en identifiant les étapes intermédiaires de la différenciation selon un arbre de différenciation et des progéniteurs multipotents, bipotents ou unipotent (Eaves, 2015).

Pourtant, la purification cellulaire et des essais fonctionnels ont conduit à revoir ce modèle standard. Par exemple, en s'aidant de la cytométrie en flux, les progéniteurs oligopotents ont été analysés et ordonnés en fonction de leurs marqueurs phénotypiques (Bryder, Rossi and Weissman, 2006; Wilson *et al.*,

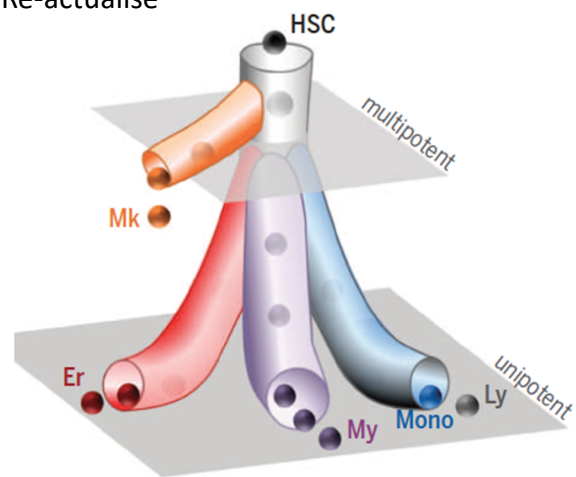
2015) (figure 5-2, légendes page suivante). Chez la souris, l'identification de progéniteurs multipotents « lymphoid-primed » (LMPP) défend l'hypothèse que le lignage érythromégacaryocytaire doit être la première branche à se séparer de l'arbre, avant la spécification lymphomyéloïde. L'arbre de différenciation hématopoïétique, mis en évidence chez la souris, s'applique par défaut à l'hématopoïèse humaine car elle a été moins étudiée que le modèle murin. Récemment, Notta a montré que la hiérarchie évolue entre l'hématopoïèse fœtale et adulte conduisant à une diminution du compartiment oligopotente et une augmentation des progéniteurs unipotents (Notta *et al.*, 2016) (figure 5-1, légendes page suivante).

Figure 5 : Arbres de la hiérarchie hématopoïétique (issus de Notta (2016) et Wilson (2015))

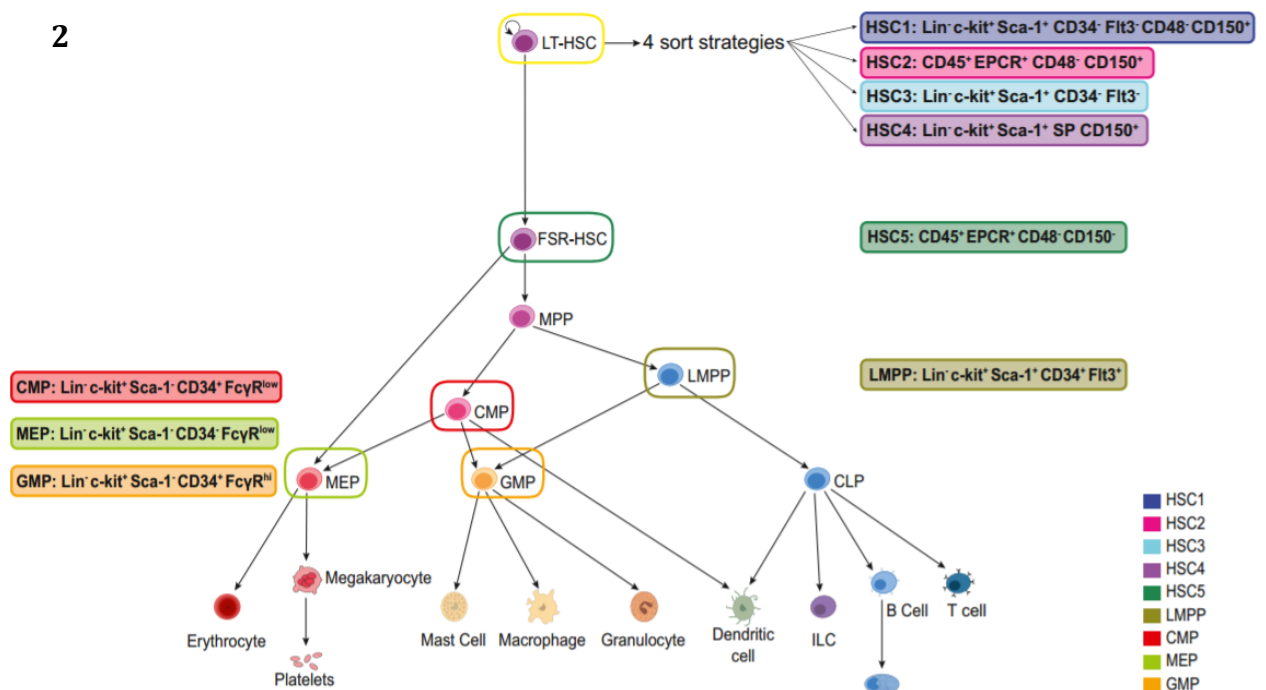
1 Modèle classique



Ré-actualisé



2



(1) L'arbre classique de la différenciation hématopoïétique adulte a été construit en fonction des résultats de tests phénotypiques et des propriétés biologiques des différentes colonies par analogie à l'hématopoïèse murine. Il montre les compartiments intermédiaires, des sous-groupes de progéniteurs de lignage restreint. L'arbre ré-actualisé, proposé par Notta en 2016, montre qu'une majeure partie des progéniteurs hématopoïétiques adultes sont restreints à un chemin unipotent.

(2) Les sous-populations sont distinguées selon leurs marqueurs phénotypiques (Wilson 2015). Il a été utilisé pour l'analyse RNAseq à l'échelle unicellulaire des sous-populations hématopoïétiques murines.

Er, érythroïde; *Gran*, granulocyte; *Mk*, mégacaryocyte; *Mono*, Monocyte; *Ly*, Lymphocyte; *LT-HSC*, long-term hematopoietic stem cell; *CMP*, common myeloid progenitor; *CLP*, common lymphoid progenitor; *MPP*, multipotent progenitor; *LMPP*, lymphoid-primed multipotent progenitor; *MEP*, Mega-erythroid progenitor; *GMP*, Granulomonocytic progenitor.

D'autres critères tels que les sites d'hypersensibilité de l'ADN à la DNaseI ont permis de distinguer les cellules souches embryonnaires (cellules ES) des CSH hématopoïétiques car la chromatine des cellules ES est moins dense et donc les sites sensibles à la digestion par la DNaseI sont plus accessibles (Ugarte *et al.*, 2015). Ce test ne permet pas de séparer les compartiments CSH, GMP ou MEP, y compris quand les CSH sont induites en cycle par le G-CSF. Une condensation progressive de la chromatine et la diminution du niveau d'euchromatine est observée au cours de la différenciation : 79% d'euchromatine dans les cellules ES, 53 à 57% dans les CSH, MPP et GMP et 34 à 37% dans les cellules myéloïdes matures et cellules lymphoïdes B. Ces résultats ont orienté les recherches vers l'étude des marques de méthylation H3K9, H3K27 (marques répressives) ou H3K4, H4K16, H4K20 (marques actives) mais n'ont pas permis de distinguer de variation dans le niveau global de méthylation entre les différentes populations. En revanche la marque H3K9me3 est progressivement relocalisée en périphérie nucléaire, ce qui suggère une régulation particulière du programme de transcription (Ugarte *et al.*, 2015). Ces travaux ne permettent néanmoins pas de distinguer les CSH des progéniteurs.

6. Identification du destin hématopoïétique à l'échelle unicellulaire

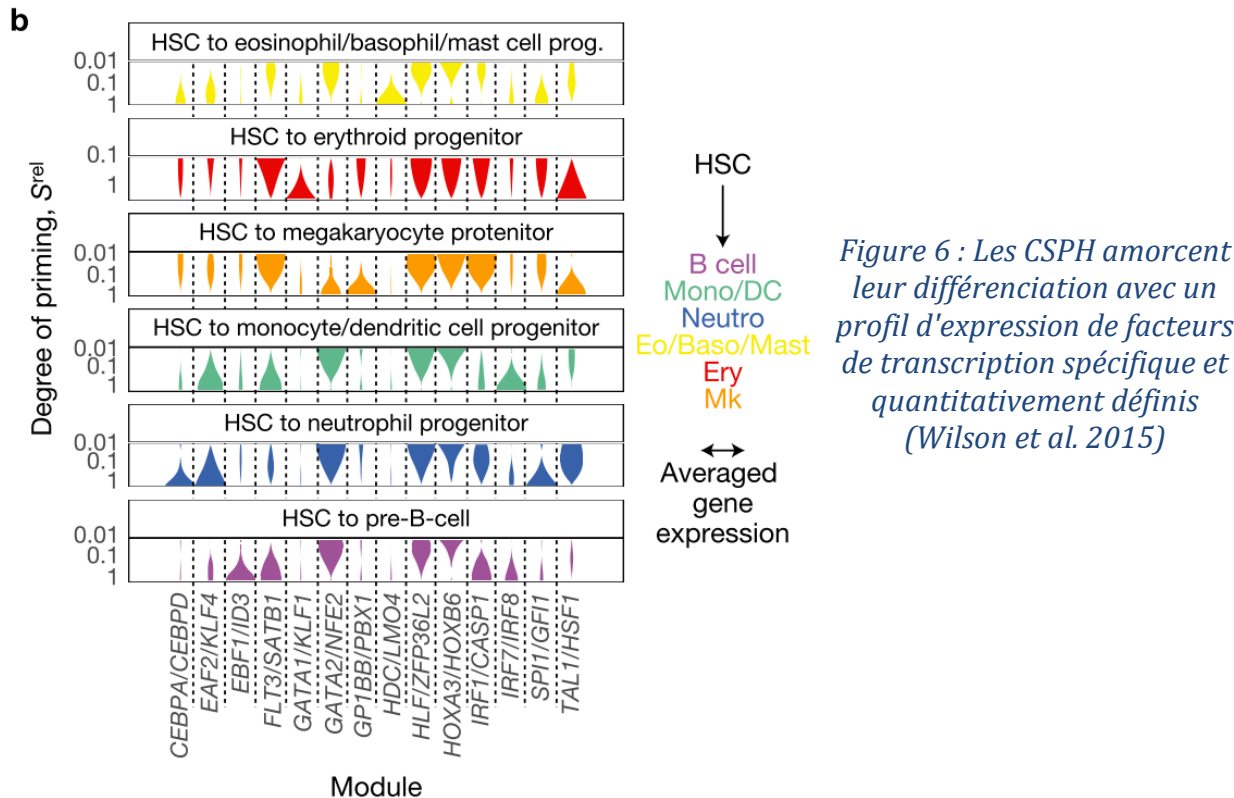
La cytométrie en flux a permis d'immenses avancées dans la caractérisation des sous-populations hématopoïétiques mais les analyses des cellules triées en groupe sur l'expression de marqueurs membranaires communs ne permettent que d'observer des comportements « moyens ». Cette technique gomme l'hétérogénéité et les capacités individuelles de chaque cellule. Il a été démontré par des expériences de transplantation d'une unique cellule souche que la pureté réelle des CSH murines (Lin-CD117+Sca-1+CD48-CD150+ ou CD45+CD48-CD150+

EPCR+) est d'environ de 40-50% (Wilson *et al.*, 2015). Les techniques récentes de séquençage à l'échelle unicellulaire (single-cell RNA-sequencing, scRNA-seq), de cytométrie de masse (CyTOF), de barcoding (à l'aide de sites d'intégration ou de transposons) étudient de manière très précise l'organisation de la hiérarchie hématopoïétique à l'échelle unicellulaire.

Les techniques de barcoding ont l'immense avantage de permettre de suivre la cellule vivante avec son tag unique au cours de sa différenciation alors que le scRNA-seq et la cytométrie de masse permettent d'étudier les similitudes et différences de cellules classées au sein d'une même sous-population à un instant T (Perié and Duffy, 2016).

Les approches par scRNA-seq et leurs ascensions fulgurantes, revues en 2017 par Picelli, permettent l'étude du transcriptome de milliers de cellules individuelles : CEL-seq (Cell Expression by Linear amplification and sequencing, (Hashimshony *et al.*, 2012), CytoSeq (librairie préparée dans quelques picolitres) ou Drop-seq (librairie en goutte), MARS-seq (automated massively parallel RNA single-cell sequencing), SMART-seq2 (Switching Mechanism At the end of the 5'-end of the RNA Transcript sequencing), STRT/C1 (Single-cell Tagged Reverse Transcription Sequencing), Tn5 transposase ou Nanopore (Picelli, 2017). Ainsi de nouvelles sous-populations au sein des différents clusters sont déjà décrites, par exemple basées sur l'expression de facteurs de transcription (Paul *et al.*, 2015) ou ont montré que des sous-fractions de populations de cellules triées sur des marqueurs phénotypiques distincts telles que CSH et progéniteurs partagent en réalité des profils très similaires (89% overlap) (Wilson *et al.*, 2015). Ces CSH « progéniteurs-like » représentent probablement des « fausses » CSH. Des travaux ont permis d'identifier un sous-groupe de CSH en comparant le profil d'expression de facteurs de transcription (molecular overlapping population : MolO) de 5 groupes de CSH triées par des stratégies différentes, en supposant que les « vraies » CSH de chaque groupe seraient celles qui partageraient un profil homogène (figure 6) (Wilson *et al.*, 2015). Ils ont confirmé le caractère souche de cette sous-population en réalisant des tests *in vitro* de culture de cellules isolées ainsi que des greffes chez la souris. En associant les résultats obtenus de profils d'expression formant une « signature MolO » aux les marqueurs de surface, ils ont montré que pour isoler les « vraies » CSH murines, il faut trier celles qui expriment

des niveaux élevés de CD150 et le Sca-1 associés à l'expression du marqueur EPCR (CD201), et à une expression faible du CD48, Ce phénotype permet d'isoler une population capable de reconstitution à hauteur de 70% (au lieu des 40-50% habituellement obtenus en triant sur Lin-CD117+Sca-1+CD48-CD150+). L'étude des profils transcriptomiques des CSH et progéniteurs à l'échelle unicellulaire permet ainsi d'affiner les critères de définition des CSH et également d'exclure des populations contaminantes.



En 2017, Velten et al. ont publié un important travail portant sur des cellules humaines issues de MO de 2 donneurs sains, utilisant la technologie scRNA seq associée à de la cytométrie en flux et des essais fonctionnels à l'échelle unicellulaire (Velten *et al.*, 2017). L'analyse transcriptomique du compartiment Lin-CD34+CD38- n'a pas pu mettre en évidence des clusters hiérarchiques distincts au sein de l'arbre de différenciation. Ils suggèrent que les CSH et les progéniteurs précoces forment en réalité un continuum de cellules indifférenciées faiblement induites et appelées « CLOUD-CSPH » (continuum of low-primed undifferentiated HSPC, figure 7).

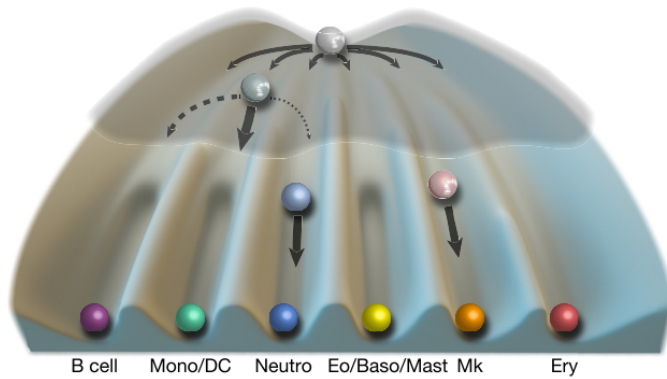


Figure 7 : d'après l'analyse transcriptomique de single cell RNaseq associé à des tests fonctionnels, les CSPH forment un CLOUD-CSPH : continuum of low-primed undifferentiated HSPC (Velten et al., 2017)

L'amorçage défini par les facteurs induisant les CSPH vers un des lignages matures a été évalué quantitativement pour challenger les hypothétiques trajectoires de différenciation. A quel moment une CSPH ne peut-elle plus changer de destinée ? Ce travail les a conduits à proposer un nouveau modèle de différenciation, non plus basé sur un arbre avec des étapes intermédiaires mais comme une évolution graduelle, un continuum d'états transitoires, un flot continu de différenciation comme un grand toboggan. Au fur et à mesure de la descente, les cellules s'engagent dans une voie qui va les empêcher de changer d'issue, comme des barrières de plus en plus infranchissables.

Dans leur court article, Hirschi et al résumant et illustrent (figure 8) joliment ce travail avec cette phrase : « chaque cellule est un arc-en-ciel » (Hirschi, Nicoli and Walsh, 2017).

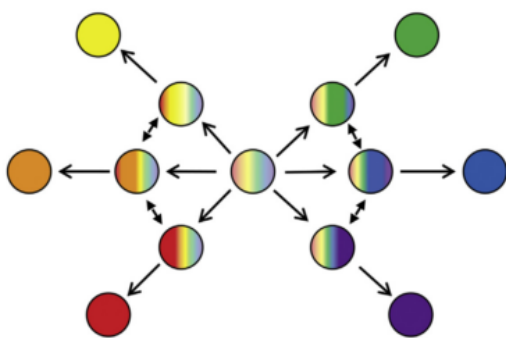


Figure 8 : chaque cellule est un arc-en-ciel, évoluant progressivement vers un lignage défini (Hirschi, Nicoli and Walsh, 2017)

Chapitre 2 : Niches / Microenvironnement(s)

Pour réguler, maintenir, protéger et soutenir l'hématopoïèse, le microenvironnement médullaire (ou stroma) forme un support spécialisé au sein de la moelle osseuse, appelé « niche hématopoïétique » (Schofield, 1978). Ce concept présente la niche comme un environnement cellulaire et moléculaire où s'ancrent les CSH et leurs progéniteurs, leur permettant ainsi de recevoir les signaux nécessaires à leur auto-renouvellement à long et court terme. Ces signaux incluent le contrôle de la quiescence, de l'engagement et de la différenciation. Depuis que la localisation des CSH et des progéniteurs s'est précisée, plusieurs types cellulaires servant de niche ont été identifiés. De même, les mécanismes qui régulent les interactions des CSH avec leurs niches commencent à être mieux compris. L'ensemble de ces travaux indique qu'il existe plusieurs niches qui fonctionneraient à différents niveaux de la hiérarchie hématopoïétique et dont l'importance dépend de l'état d'activation ou de quiescence des CSH (Mendelson and Frenette, 2014). Des niches spécifiques permettraient aussi de réguler les réponses au stress hématopoïétique.

1. Organisation fonctionnelle du stroma

Le stroma de la moelle osseuse est une composition complexe de cellules d'origine hématopoïétique et d'origine mésenchymateuse qui ont la faculté de synthétiser la matrice extracellulaire (MEC). Les recherches actuelles sur le microenvironnement hématopoïétique proposent qu'il existe plusieurs organisations possibles de ces cellules permettant de former plusieurs niches, adaptées pour chaque type cellulaire de la moelle, CSH et progéniteurs.

La moelle osseuse est confinée dans l'os spongieux au sein de la cavité médullaire. L'interface entre l'os et la moelle osseuse constitue l'endoste. L'irrigation des tissus se fait à partir des artères nourricières et des veines centrales de l'os long qui se ramifient pour donner des capillaires au niveau du cortex osseux ou de la diaphyse qui deviennent des sinusoides, unité minimale médullaire. Le système de vascularisation de la moelle osseuse lui assure une bonne nutrition et oxygénation. De plus, il permet une distribution efficace des facteurs de croissance ainsi que la libération des cellules hématopoïétiques

matures dans le sang, qui sont autant d'éléments essentiels pour le bon déroulement de l'hématopoïèse. Cette structure médullaire associe également un réseau nerveux sympathique.

2. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

A l'origine des cellules stromales, les cellules stromales ou souches mésenchymateuses (CSM) sont multipotentes et peuvent se différencier en adipocytes, ostéoblastes, chondrocytes et myofibroblastes, similaires à des cellules musculaires lisses. Le caractère souche des CSM a été mis en évidence par leur capacité d'auto-renouvellement dans un modèle murin ainsi que par leur profil d'expression où l'on retrouve l'expression de gènes associés aux cellules souches (oct4/sox2 et Nanog) (Desbourdes *et al.*, 2017). A l'origine, elles ont été décrites comme des fibroblastes fusiformes issus de la MO, capables de former des colonies adhérentes au plastique : les CFU-fibroblastiques (CFU-F) (Dexter, Allen and Lajtha, 1977).

Mieux caractérisées depuis, les recherches ont montré que les CSM sont impliquées de façon majeure dans la protection des CSH en participant à leur auto-renouvellement, leur prolifération et l'inhibition de l'apoptose. Il a d'ailleurs été démontré *in vivo* que la greffe conjointe de CSH et de CSM assure une meilleure reconstitution hématopoïétique (Lazarus *et al.*, 2005). *In vivo*, chez la souris, une partie des CSH est retrouvée au contact d'une sous-population de CSM dites péricytes. Ces cellules sont majoritairement juxtaposées à l'endothélium sinusoidal. Elles sont réticulaires et se caractérisent par de longues extensions cytoplasmiques sécrétant abondamment CXCL12 (CXCL12 abundant reticular cells : CAR cells) et produisent du SCF (Sugiyama *et al.*, 2006). La déplétion de ces cellules est associée à une perte partielle des CSH et à une diminution de leur prolifération suggérant que les CAR permettent la prolifération et l'auto-renouvellement. Ces données ainsi que des résultats montrant que la délétion conditionnelle de CXCR4 dans un modèle murin résulte en une diminution importante du nombre de CSH mais pas dans l'expansion de leurs progéniteurs matures montrent que le couple CXCR4/CXCL12 joue un rôle majeur dans le contrôle des interactions des CSH et des progéniteurs avec les CSM. En accord avec la notion que les CSM sont des acteurs majeurs de la niche, les travaux récents de

Méndez-Ferrer ont identifié une population de CSM exprimant la Nestine (CSM-N+) et le récepteur de la leptine (Méndez-Ferrer *et al.*, 2010). Ces cellules sont également périvasculaires et sont associées à des fibres nerveuses sympathiques. Comme les CAR, ces cellules expriment davantage de transcrits des gènes associés au maintien du potentiel souche (CXCL12, SCF, Angpt1 ou VCAM1) que toutes les autres sous-populations stromales. La déplétion des CSM-N+ est associée à une diminution de 90% des capacités de domiciliation des CSPH dans la MO de receveurs et favorise leur mobilisation vers la rate. Tout comme les CAR, les CSM-N+ ont un potentiel de différenciation vers les lignages adipocytaire et ostéogénique. Cependant les CAR sont plus abondantes que les CSM-N+ suggérant que ces deux populations se recoupent en partie.

Pour analyser plus finement l'organisation des niches, l'équipe de Frenette a utilisé l'immunofluorescence en microscopie confocale associée à une modélisation computationnelle et a montré que les CSH sont localisées à proximité de petites artérioles de l'endoste (Kunisaki *et al.*, 2013). Ces structures vasculaires caractérisées par la présence de nerfs sympathiques et de cellules musculaires lisses sont entourées de rares CSM de type péricytaire exprimant le protéoglycane NG2. Ces cellules n'expriment pas le récepteur de la leptine et sont donc distinctes des CSM-N+ Leptine récepteur+. Leur déplétion conditionnelle augmente la mise en cycle des CSH et réduit leur capacité de population à long-terme. Les artérioles pourraient donc être des structures qui irriguent et innervent l'endoste. Ces résultats suggèrent que les niches endostéales sont fortement vascularisées tout particulièrement par des artérioles contenant des sous populations de CSM qui recoupent en partie celles qui sont retrouvées aux abords des vaisseaux plus larges des niches vasculaires. Quelle que soit leur localisation, les CSM peuvent être enrichies chez la souris par cytométrie en flux dans des populations hématopoïétiques lignage négatives, CD31- mais exprimant les marqueurs membranaires Sca+ CD51+ PDGFR (platelet-derived growth factor) alpha+ à partir du fût de MO ou suite à la digestion de l'os par la collagénase (Winkler *et al.*, 2010).

3. Cellules dérivées des CSM

a) **Les ostéoblastes et les ostéoprogéniteurs** forment la limite de l'endoste et ont pour fonction principale la formation osseuse par synthèse de

tropocollagène et d'ostéopontine (Ho *et al.*, 2015). Cette partie de l'os dite os trabéculaire héberge une partie des CSH et a été appelée niche endostéale (Gong, 1978).

Elle a été la première niche stromale décrite grâce à des travaux *in vitro* de coculture montrant que les ostéoblastes supportent l'hématopoïèse primitive en produisant des cytokines dont le G-CSF, CXCL12, l'angiopoïétine1, et les BMP 11,12. En 2003, un modèle murin d'inactivation conditionnelle du récepteur type IA (BMPRI1A) caractérisé par une augmentation des ostéoblastes a mis en évidence une corrélation directe entre le nombre d'ostéoblastes spindle-shaped N-cadhérine+ CD45- (SNO), dépendant de la signalisation des BMP, et le nombre de CSH (Zhang *et al.*, 2003). La même année, grâce à un modèle murin modifié génétiquement pour produire du récepteur de parathyroïde hormone spécifiquement par les ostéoblastes, il a été montré que les récepteurs de PTH contrôlent le nombre d'ostéoblastes (Calvi *et al.*, 2003). Le nombre ainsi augmenté d'ostéoblastes s'accompagne d'une augmentation du nombre de CSH *via* la signalisation activée de Notch (Lawal *et al.*, 2017). Depuis la publication de ces travaux princeps et grâce à une meilleure connaissance du phénotype des CSH, l'importance des ostéoblastes et de la N-cadhérine a été confirmée uniquement pour le compartiment de progéniteurs immatures. En effet, ni la déficience en biglycan qui affecte les ostéoblastes et la structure osseuse (Kiel, Radice and Morrison, 2007), ni la délétion conditionnelle de la N-cadhérine (Kiel *et al.*, 2009) n'entraîne de défaut du compartiment des CSH ou de l'hématopoïèse à long terme chez la souris. L'impact des ostéoblastes sur les progéniteurs est probablement indirect puisque les progéniteurs et les ostéoblastes ne sont pas colocalisés.

La niche endostéale pourrait réguler les CSH au travers de l'hypoxie qui la caractérise. En effet, l'hypoxie de l'endoste serait comprise entre 0,1 et 5% selon un gradient dépendant de la distance de cette région par rapport au système vasculaire. Le pimonidazole, un marqueur d'hypoxie, a confirmé que le plus fort potentiel souche est contenu dans la fraction la plus hypoxique (Parmar *et al.*, 2007). Les facteurs HIF (hypoxia inducible factor) sont les gènes maîtres des réponses hypoxiques. Ces facteurs de transcription contiennent un domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH) et un domaine Per-Arnt-Sim (PAS). Le domaine BHLH permet la dimérisation avec la sous-unité HIF-1 β / ARNT (aryl

hydrocarbure récepteur nucléaire Translocator), tandis que le domaine PAS permet la liaison de l'ADN. En normoxie, HIF-1 α et HIF-2 α sont hydroxylés par des prolyle hydroxylases (PHD) qui permettant leur reconnaissance par un complexe comprenant une ubiquitine ligase E3 et la protéine von Hippel-Lindau (VHL) qui vont mener à sa dégradation protéolytique par le complexe du protéasome. Dans des conditions hypoxiques, les PHD sont inactifs, les protéines HIF- α sont stabilisées et peuvent transloquer dans le noyau pour une dimérisation avec HIF-1 β /ARNT et une activation des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE).

Plusieurs travaux ont démontré que la régulation des niveaux de HIF-1 α est essentielle pour le maintien des CSH dans la moelle osseuse. En effet, la délétion de Hif-1 α est associée à la mise en cycle des CSH ainsi que la diminution de leur nombre en réponse à différents facteurs de stress comme la transplantation, la myélo-suppression et le vieillissement. L'activation transcriptionnelle de Hif-1 α par Meis1 est impliquée dans le phénotype anaérobie qui caractérise les HSC en hypoxie (Simsek *et al.*, 2010). Plus récemment, le rôle de HIF-2 α a été étudié dans les CSH par une stratégie ShRNA (Rouault-Pierre *et al.*, 2013). Ces travaux ont montré que la diminution de HIF-2 altère leur capacité de repopulation à long terme. Les CSH déficientes en HIF-2 α ont une augmentation de la production des espèces réactives d'oxygène (ROS), associée à une augmentation de l'apoptose. La dérégulation de HIF-2 α entraîne également une diminution de la capacité de greffe des cellules de LAM humaines. Finalement, HIF-3 α est fortement exprimé dans les CSH humaines. Au total, ces résultats indiquent que les protéines HIF régulent l'expression de divers gènes qui modulent la prolifération des CSH normales et leucémiques ainsi que leur survie et leur métabolisme.

b) **Les myofibroblastes** représentent la majorité des cellules stromales et sont des acteurs majeurs de la formation de la fibrose suite à une lésion.

Elles sont structurellement proches des cellules musculaires lisses et sécrètent de nombreuses protéines matricielles qui composent la matrice extracellulaire. Les myofibroblastes qui entourent les sinusoides sont appelées cellules péricytaire. Une sous-fraction des progéniteurs péricytaire a été désignée CAR-cells pour « CXCL12-abundant reticular cells » en raison de leur riche sécrétion de CXCL12. Ces cellules produisent également du SCF et participe à l'auto-renouvellement des

CSPH (Sugiyama *et al.*, 2006). Les CAR cells sont une population stromale hétérogène, non clairement définie par des marqueurs phénotypiques, dont une partie est considérée comme des CSM.

- c) **Les adipocytes** présentent des vacuoles lipidiques qui vont libérer des acides gras et des esters de cholestérol nécessaires à la formation des membranes cytoplasmiques.

Ils synthétisent de l'adiponectine et du TNF- α mais aussi de la leptine, hormone impliquée dans la formation de BFU-E et CFU-GM (Umemoto *et al.*, 1997). Leur expansion au cours de l'âge est accompagnée d'anomalies hématopoïétiques suggérant qu'ils régulent négativement les CSH (Naveiras *et al.*, 2009). En accord avec cette hypothèse, l'inhibition de l'adipogénèse favorise la greffe hématopoïétique après irradiation et permet une meilleure repopulation à long terme dans les modèles murins lipotrophiques. Un travail publié en 2017 a apporté la démonstration directe par modélisation *in vivo* chez des souris que l'âge ou l'obésité sont des causes de détérioration de la différenciation mésenchymateuse au profit des adipocytes, ayant pour conséquence la réduction de la reconstitution hématopoïétique chez des souris irradiées (Ambrosi *et al.*, 2017).

4. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales des sinusoides vasculaires ou endothélium forment une monocouche de cellules contrôlant le passage des cellules hématopoïétiques matures vers la circulation (diabase). Bien que localisés en majorité dans l'environnement médullaire, une fraction faible des CSH et les progéniteurs sont retrouvés dans la circulation. Cette circulation qui augmente en cas de stress hématopoïétique et qui implique un passage au travers de l'endothélium est appelée mobilisation. De même, le retour vers la moelle, processus appelé domiciliation ou homing implique la traversée de la monocouche endothéliale. Le contrôle de la migration est effectué par des molécules d'adhérence telle que la E-sélectine ou le VCAM-1 et la chémoattraction par CXCL12 (Mendelson and Frenette, 2014). Les cellules endothéliales sécrètent également du SCF qui participe au maintien des CSH. Les sinusoides sont recouvertes d'une couche discontinue de péricytes allongés.

L'amélioration des techniques d'imagerie et de nos connaissances sur le phénotype des CSH ont permis d'investiguer plus précisément la localisation des CSH. En effet en 2006, un travail majeur a montré que les CSH murines étaient très fortement enrichies dans une population exprimant le CD150 (Yilmaz, Kiel and Morrison, 2006). Sur des coupes de tissus, les techniques d'immunohistochimie ont distingué les CSH par un marquage CD150+CD48-CD41- montrant que la majorité sont localisées à proximité des vaisseaux sinusoides (à moins de 5µm) alors que 80% des CSH sont à plus de 10 µm de l'endostéum (figure 9) (Kiel *et al.*, 2005; Mendelson and Frenette, 2014). Il a donc été proposé l'existence de niches vasculaires qui disposent de davantage de nutrition et d'oxygénation par la proximité du réseau vasculaire. Cette proximité avec les cellules endothéliales ou périvasculaires facilite la migration des CSH dans le système sanguin et est nécessaire aux réponses de stress. Elle coïncide avec l'abondance de CXCL12 et de E-sélectine (Xie *et al.*, 2009). Les cellules endothéliales sécrètent de l'angiopoïétine like-3, impliquée dans la quiescence des CSH par inhibition d'Ikaros (Zheng *et al.*, 2011). Des travaux publiés utilisant l'imagerie *in vivo* à haute résolution chez la souris ont montré que les CSH demeurent dans la niche périvasculaire, peuvent s'y diviser. Cette localisation Les CSPH à proximité de la niche périvasculaire sont davantage exposées aux cytokines et en cycle. Ces différentes données suggèrent que cette niche est plus prompte au maintien de l'homéostasie hématopoïétique par la possibilité de réponse rapide aux besoins physiologiques.

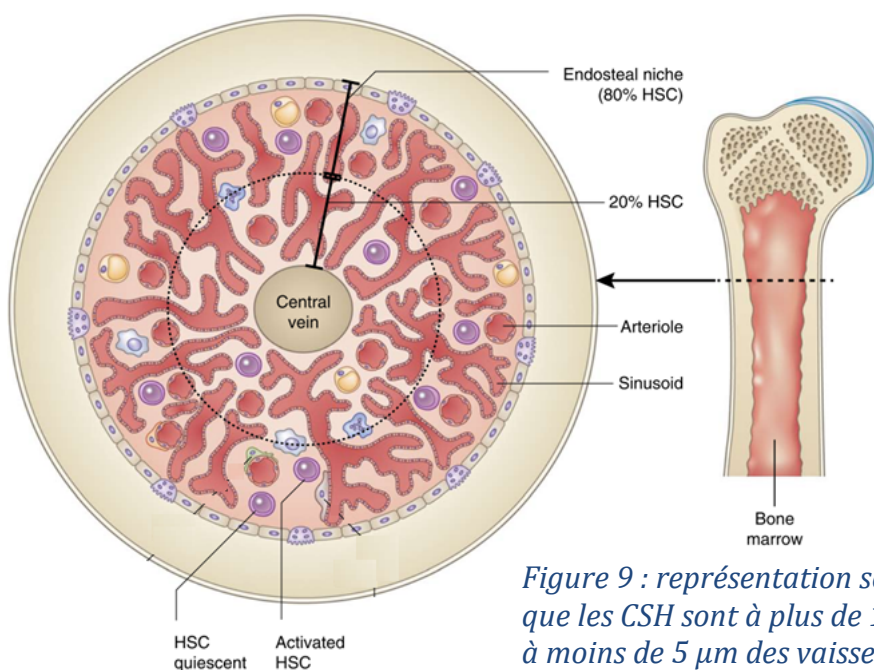


Figure 9 : représentation schématique montrant que les CSH sont à plus de 10 µm de l'endostéum et à moins de 5 µm des vaisseaux sinusoides selon Mendelson et Frenette (2014).

5. Régulation des CSH par les cellules hématopoïétiques matures

Au cours de ces dernières années, la notion de niche pour les CSPH a dépassé le compartiment des cellules dites stromales pour s'étendre aux cellules hématopoïétiques dont les cellules macrophagiques. En effet, l'utilisation du chlodronate qui induit une déprivation des macrophages de la MO caractérisés par l'expression du CD169 aboutit à une mise en circulation des CSH. Ces résultats indiquent que les macrophages participent à la rétention médullaire des CSH et à leur maintien notamment en produisant des molécules d'adhérence (VCAM-1) au sein du stroma (Chow *et al.*, 2011). Ils régulent également les neutrophiles au sein de la MO qui participent à la régulation du nombre de cellules sécrétant du CXCL12. Les macrophages seraient également impliqués dans le maintien des fonctions des ostéoblastes mais ces résultats sont contestés par une autre publication qui n'observe pas de modification du compartiment ostéoblastique en cas de perte du compartiment macrophagique (Winkler *et al.*, 2010).

Les ostéoclastes sont des macrophages différenciés et spécialisés qui se localisent autour du tissu osseux. Ils ont une action de dégradation de l'os par leur forte sécrétion de collagénase et d'enzymes protéolytiques. Leur rôle est controversé mais ils pourraient réguler la mobilisation des CSH (Lane, Scadden and Gilliland, 2009). Les ostéoclastes, par lyse des constituants osseux, libèrent du TGF- β , BMP-2 et BMP7 qui participent également à la quiescence des CSH, d'après les modèles *in vitro* et *in vivo* (Kollet *et al.*, 2006).

Les mégacaryocytes sont localisés majoritairement au niveau des sinusoides médullaires. En plus de former des plaquettes par thrombopoïèse, ils peuvent promouvoir la construction osseuse par la sécrétion de BMP-2, BMP-4 et BMP-6 (Bone Morphogenetic Proteins), et favorisent ainsi la prolifération des ostéoblastes et l'inhibition des ostéoclastes (Ho *et al.*, 2015). L'utilisation de souris avec une délétion conditionnelle de CLEC2 (protein C-type lectin-like receptor 2) a montré que les mégacaryocytes CLEC2-KO produisent moins de TPO. Ces souris CLEC2-déficientes ont des CSH qui sont davantage en cycle et un potentiel de reconstitution de l'hématopoïèse amoindri (Nakamura-Ishizu *et al.*, 2015). L'injection de TPO aux souris CLEC2-déficientes restaure le potentiel des CSH. L'analyse d'expression de gènes des mégacaryocytes de la MO a mis en évidence

l'expression de CXCL4, aussi connus sous le nom de PF4 (Bruns *et al.*, 2014). L'injection intrapéritonéale de CXCL4 à des souris induit une diminution du nombre CSH à cause d'une augmentation de la quiescence et à l'inverse les souris CXCL4-KO ont un plus grand nombre de CSH et une augmentation de leur prolifération.

6. La matrice extracellulaire (MEC)

Elle est constituée de nombreuses protéines solubles et insolubles sécrétées par les cellules stromales. La MEC forme un maillage composé de fibres de collagènes (types I, III et IV), de glycoprotéines d'adhérence : fibronectine, ostéopontine, laminine, et de protéoglycanes comme l'héparane sulfate (Konopleva *et al.*, 2009). Le maillage dense de fibres forme un réseau qui structure le stroma et permet aux cellules hématopoïétiques de s'ancrer.

7. Le système nerveux sympathique

L'ostéoimmunologie décrit les relations entre le système nerveux et l'inflammation osseuse et plus récemment le rôle du système nerveux dans la niche hématopoïétique est étudié. Plusieurs travaux montrent que sa participation est majeure dans la régulation de la niche. Les cellules nerveuses sympathiques produisent des neuromédiateurs dont la noradrénaline, régulent le cercle circadien et ainsi la production de nombreuses hormones (dont la leptine) (Méndez-Ferrer *et al.*, 2010). Il a été démontré que les cellules de la niche stimulées par ces neuromédiateurs modifient leur production de facteurs de la niche comme le CXCL12. Le système nerveux sympathique participerait ainsi au maintien des CSH. Les agonistes dopaminergiques (épinéphrine et norépinéphrine) ont également une action directe sur les progéniteurs en induisant une augmentation de la prolifération et la formation de colonies *in vitro* (Kollet *et al.*, 2012). Les cellules de Schwann non-myélinisées aussi participent au maintien de la quiescence des CSH en convertissant la forme inactive de TGF-B en une forme active, restreignant la mise en cycle des CSH (Yamazaki *et al.*, 2011).

8. Les interactions entre hématopoïèse et stroma

Les interactions entre cellules hématopoïétiques et cellules stromales sont bidirectionnelles, complexes, directes ou indirectes. Les molécules d'adhérence intercellulaires qui lient les cellules hématopoïétiques et les cellules stromales ont un rôle majeur dans la communication et les signaux de domiciliation et de quiescence des CSH. Par exemple l'intégrine VLA-4 (very late antigen-4/ α 4 β 1/CD49d) exprimée par les cellules hématopoïétiques peut se lier à VCAM-1 exprimée par les cellules stromales et la fibronectine de la MEC. L'inactivation de VLA-4 lève la rétention des CSH dans la MO et induit leur mobilisation (Lichterfeld *et al.*, 2000). L'intégrine VLA-5 (very late antigen-5/ α 5 β 1/CD49e) peut se lier au domaine RGD de la fibronectine. Les cellules hématopoïétiques expriment le récepteur à l'acide hyaluronique qui se lie à l'ostéopontine. Les cadhérines interviennent également dans les adhérences des CSH à la MEC et la N-Cadhérine participe à la quiescence des CSH.

L'une des molécules impliquées de façon majeure dans la régulation de la niche et la domiciliation des CSH est la chimiokine CXCL12. Elle agit en tant que chémoattractant des CSH leur permettant de se localiser dans des niches optimales. Elle permet aux CSH de circuler entre la moelle et le sang et inversement (Lapidot, Dar and Kollet, 2005). Elle pourrait également avoir des effets propres sur la quiescence et la prolifération. La signalisation entre stroma et cellules hématopoïétiques au sein de la niche fait intervenir non seulement CXCL12 mais également les cytokines comme la TPO, le SCF, le flt3-ligand. Les principaux couples ligand/récepteurs impliqués dans la régulation des CSH sont présentés dans la figure 10 (Yue Zhang *et al.*, 2012).

9. Une, deux ou de multiples niches ?

Une niche se définit par sa structure et par sa fonction. Deux types de niches hématopoïétiques majeures ont été décrites, selon leur proximité de l'os : la niche endostéale à la bordure des ostéoblastes et la niche vasculaire située au centre de la MO, proche des artères nourricières. Les travaux récents sur la niche artériolaire proposent un modèle de niches plus complexes. En effet, les techniques de visualisation sur animal vivant ont révélé que la niche endostéale est également très vascularisée. Les deux niches pourraient donc être bien plus proches et

collaboratives que les recherches passées pouvaient le suggérer (Ehninger and Trumpp, 2011). De plus, il est clair que les CSH sont une population hétérogène et qu'une partie de la variabilité observée soit due aux différentes niches ou aux différents facteurs ou concentrations de facteurs que reçoivent les CSH en fonction de leur microenvironnement.

Figure 10 : De nombreux ligands participent aux interactions moléculaires entre les CSH et leur niche (Yue Zhang 2012)

Table 1 The key niche-related molecules that regulate HSCs or/and LSCs

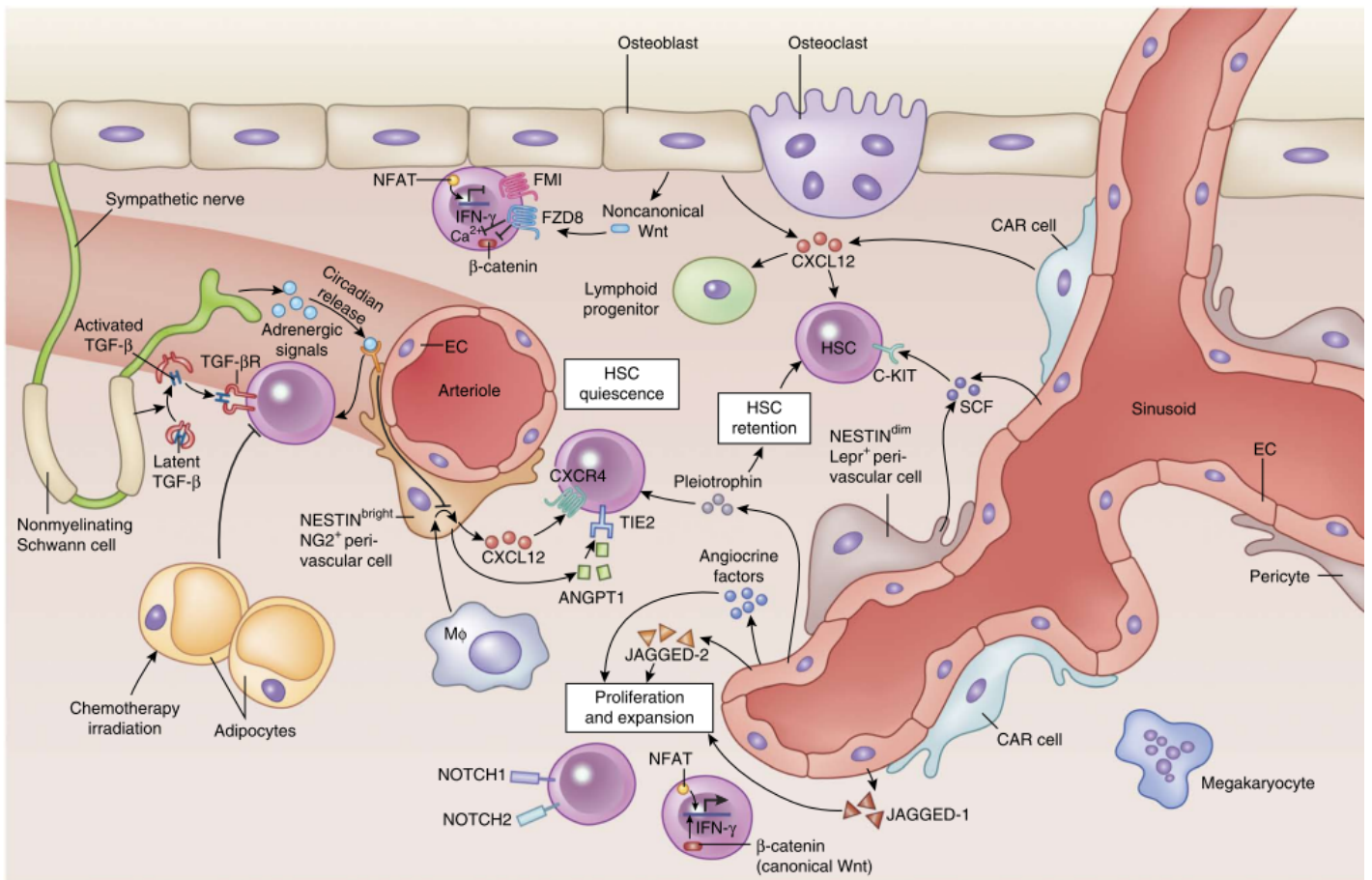
Molecule	Relevant stromal cells	Regulation on HSCs	Regulation on non-HSC hematopoietic cells
N-cadherin	Endosteal osteoblasts	Homophilic tethering	?
Fibronectin		Integrin $\alpha v \beta 3$	CD11b/NK cells
Jagged-1/2, DLL1	MSCs, osteoblasts, endothelium	Notch1,2	Notch/T cells, Megakaryocyte
SCF	Endothelium, peri-vascular stromal cells, osteoblast, leukemia cells	c-Kit	c-Kit/mast cells, B cells, T cells
SDF-1 α	CAR cells, osteogenic progenitors, osteoblasts	CXCR4	CXCR4/leukocytes
Angiopoietin-1	Endothelial cells, mesenchymal progenitors, hematopoietic cells	Tie2	
TPO		MPL	MPL/thrombopoiesis
Wnt/DKK1	Osteoblast, mesenchymal progenitors	Fz/LRP5/6 co-receptor	Fz/LRP5/6 co-receptor/Myeloid progenitors, T cells
VEGFA	HSC/leukemia cells	Flk1	
Hedgehog	?	Ptch-Smo	Ptch-Smo/T cell, B cell, erythroid progenitors
TGF β	GFAP ⁺ Nonmyelinating Schwann cells	TGFBR	TGFBR/T cells, DCs
CD44-ligands			
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Osteoblasts,osteoclasts,endothelial cells	COX-1 and COX-2	WBC and platelets

Pour finir, tous les résultats tentant d'élucider la localisation exacte des CSH dans la ou les niches ont été obtenus chez des souris ayant reçu au préalable des doses importantes ou létales d'irradiation. Ce traitement peut induire une modification ou un remodelage non négligeable de la structure médullaire et des fonctions des différentes populations cellulaires composant les niches. Par ailleurs, la majorité de ces résultats ont été obtenus sur la population dite LSK. Avec l'utilisation du marqueur CD150 et l'évolution des techniques d'imagerie,

l'organisation des niches continuera d'être étudiée et mieux comprise dans sa complexité. La figure 11 illustre schématiquement les acteurs et leurs interactions au sein des niches médullaires.

Figure 11 : schéma récapitulatif des différents acteurs cellulaires et moléculaires de la niche.

Certains acteurs participent au maintien des cellules souches hématopoïétiques dont les péricytes, les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules CAR et le système nerveux sympathique. En revanche les adipocytes régulent négativement le maintien des CSH dans leur niche. Ce schéma a été proposé par Mendelson et Frenette (2014).



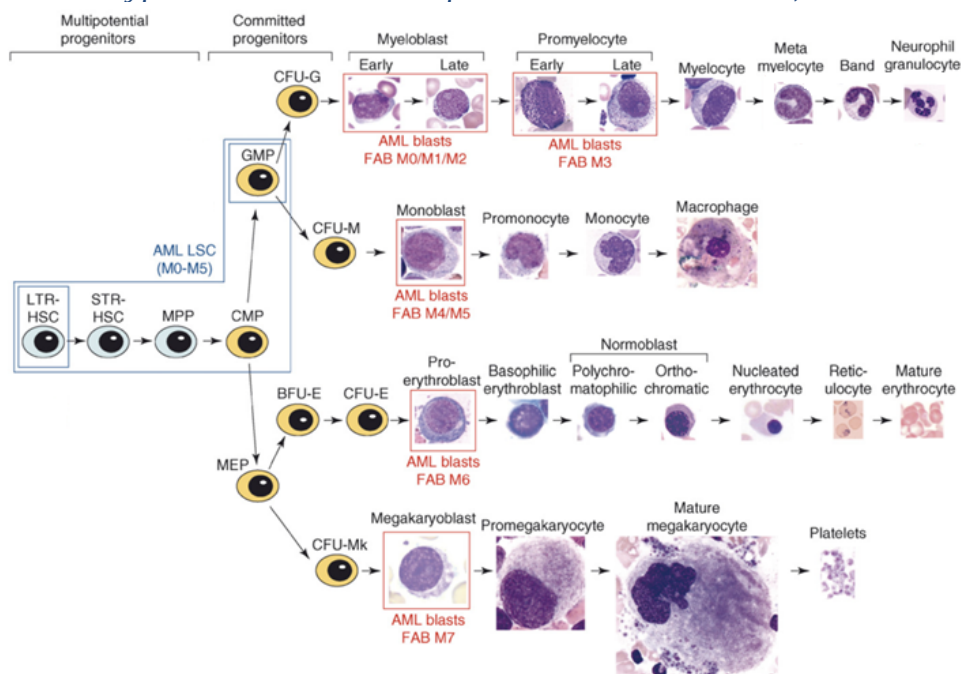
Chapitre 3 : Leucémie aiguë myéloïde et cellules souches leucémiques

1. Définition des leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

Parmi les hémopathies malignes, les leucémies sont définies par une surproduction de cellules hématopoïétiques immatures bloquées dans leur différenciation (blastes), contrairement aux syndromes myéloprolifératifs où la surproduction de cellules concerne les lignages matures. La prolifération leucémique incontrôlée se distingue selon le caractère chronique ou aigu et selon l'origine myéloïde ou lymphoïde. Ce qui fait 4 combinaisons possibles : leucémie myéloïde chronique (LMC), leucémie lymphoblastique chronique (LLC), leucémie aiguë myéloïde (LAM) et leucémie aiguë lymphoblastique (LAL).

Les LAM présentent des sous-types hétérogènes caractérisés par l'état de différenciation des blastes. Selon la classification Franco-Américano-Britannique (FAB) proposée en 1976 et révisée en 1985, les sous-types M0 à M7 sont déterminés par la morphologie cellulaire analysée en histologie (Krause and Van Etten, 2007) (Figure 12). La classification est la suivante et son incidence parmi les LAM : M0 : indifférenciée (3%) ; M1 : myéloblastique sans différenciation (15-20%) ; M2 : myéloblastique avec différenciation (25-30%) ; M3 : promyélocytaire (5-10%) ; M4 : myélomonocytaire (20-30%) ; M5 (5%) est divisée en 2 sous-groupes, M5a : monoblastique et M5b monocytaire ; M6 : érythrocytaire (5%) ; M7 : mégacaryoblastique (3-12%).

Figure 12 : diagramme du développement myéloïde normal associé aux sous-types de LAM et CSL. Adapté de Krause & Van Etten, 2007



La classification FAB représentait la première classification internationale des LAM et reposait uniquement sur les critères cytologiques ci-dessus et une mise en évidence de plus de 30% de blastes dans la MO. Les LAM, qui favorisent l'expansion clonale, s'accompagnent d'une cytopénie fonctionnelle multilignage. Le manque de cellules sanguines matures (globules rouges, plaquettes, granulocytes) induit fatigue, saignement, infections et contribue à la morbidité de la pathologie. La leucémie promyélocytaire FAB M3, traitée par l'acide tout trans-rétinoïque (ATRA) qui induit la maturation des blastes, est l'une des rares LAM à présenter un bon pronostic. Depuis les 3 dernières décennies, la survie à long terme des patients souffrants de LAM n'a pas significativement changé. Il est donc nécessaire de mieux caractériser les sous-types de LAM et leurs composants cellulaires pour proposer des traitements plus ciblés.

2. Caractérisation cytogénétique et moléculaire des LAM

Les LAM ont été caractérisées selon leurs aspects morphologiques dans la classification FAB mais apportait peu d'informations sur le pronostic du patient. En 2008, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a proposé une autre classification permettant de distinguer le pronostic d'une LAM en fonction du risque cytogénétique ou moléculaire (figure 13), classification révisée en 2016 (Vardiman *et al.*, 2009). Le diagnostic de LAM repose désormais sur la mise en évidence de plus 20% de blastes dans la MO ou dans le sang périphérique ainsi que la présence d'anomalies cytogénétiques. La classification FAB ne sert plus qu'à dissocier les LAM sans anomalie cytogénétique récurrente identifiée. Les analyses cytogénétiques sont réalisées par analyse du caryotype et par Fluorescence In-Situ Hybridization (FISH), préférentiellement à partir de prélèvement de MO. La classification 2016 requalifie l'érythroleucémie (LAM6) en leucémie aiguë érythroïde pure.

Cependant, 40 à 50% des LAM sont à caryotype normal et dans ce cas la biologie moléculaire est informative pour l'orientation thérapeutique. Elle recherche des mutations validées par l'European Leukemia Net (ELN). Cette stratification pronostique basée sur la cytogénétique et la biologie moléculaire est une aide au diagnostic et au pronostic qui est essentielle à la prise en charge des patients.

Risque	Cytogénétique (chromosomique)	Moléculaire (mutation)
Favorable	Inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1q22) : CBF-MYH11 t(8;21)(q22;q22) : RUNX1-RUNX1T1 t(15;17)(q22;q12) = PML-RARa (FAB M3 sensible à l'ATRA)	CEBPA biallélique NPM1 (sans FLT3-ITD)
Intermédiaire	Trisomie 8 seule t(9;11)(p22 ;q23) Fusion MLLT3- MLL	Cytogénétique normale + FLT3-ITD KIT (CD117)
Mauvais	Complexe (≥3 anomalies) Caryotype monosomal* Autres t(v;11)(v ;q23) Fusions MLL Anomalies des chromosomes 5 ou 7 ou 11 inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) : RPN1-EVI1 t(6;9)(p23; q34) ; DEK-NUP214 t(9;22)(q34;q11) Fusion BCR/ABL	FLT3-ITD + une anomalie TP53 Runx 1 (entité provisoire OMS 2016)

* Monosomal: ≥2 monosomies ou 1 monosomie et 1 (ou plus) défaut structural

Figure 13 : Classification simplifiée des LAM selon le risque cytogénétique ou moléculaire (Mis à jour selon l'OMS 2008 et Vardiman et al. 2009)

Depuis, de nombreuses autres mutations récurrentes ont été identifiées dans les LAM grâce aux technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) telles que DNMT3A, TET2, IDH1/2, ASXL1, EZH2 (modificateurs épigénétiques), SMC1A, SMC3, RAD21, STAG2 (cohésines), NRAS, PTPN11 (voies de transduction), SF3B1, SRSF2, U2F1 (spliceosome)(Murati *et al.*, 2012),(Thomas and Majeti, 2017). Le risque pronostique associé à ces mutations est toujours débattu (Grossmann *et al.*, 2012),(Patel *et al.*, 2012) et dépendant des anomalies associées (Walter *et al.*, 2009) ou du site de mutation lui-même. Ils ne font donc pas partie de la stratification pronostique pour le moment. Grâce aux NGS, d'autres mutations pourront encore être identifiées (Alcalay and Meani, 2003).

En plus du profil cytologique, cytogénétique et moléculaire, d'autres facteurs peuvent être associés au pronostic tels que l'âge du patient, l'état de santé général au diagnostic, ou encore des facteurs liés à la LAM du patient tels que l'hyperleucocytose au diagnostic (>100G/L), LAM secondaire à un traitement

(chimiothérapie ou radiothérapie), les transformations d'hémopathies préexistantes (syndromes myéloblastiques ou myéloprolifératifs).

Cas spécifique de MLL

MLL (Mixed Lineage Leukemia et renommé KMT2 depuis 2013) est une protéine régulatrice de la chromatine à activité méthyltransférase (histone H3 lysine 4 méthyltransférase (H3K4)), qui participe, au sein d'un large complexe protéique, au maintien du modèle d'expression établi par d'autres facteurs de transcription. Par exemple, MLL régule l'expression des gènes Hox et les réarrangements de MLL induisent une surexpression des gènes Hox, incluant HOXA7, HOXA9 et MEIS1. La dérégulation des gènes Hox est potentiellement responsable de la leucémogénèse. Les translocations impliquant le gène *MLL* induisent de nombreuses possibilités de créations de fusion de gènes partenaires avec *MLL*, 70 partenaires différents connus à ce jour, qui sont à l'origine de LAM et LAL agressives. 5 à 10% des LAM et 8 à 10% des LAL-B possèdent des réarrangements de MLL. Les fusions de *MLL* avec les gènes AF4 (ALL-1 fused gene from chromosome 4), AF9 (ALL-1 fused gene from chromosome 9), ENL (eleven-nineteen leukemia), AF10 (ALL-1 fused gene from chromosome 10), ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) et AF6 (ALL-1 fused gene from chromosome 6) représentent 85% des translocations MLL retrouvées chez les patients (Yue Zhang *et al.*, 2012). Les partenaires nucléaires tels que AF4, AF9, AF10, ENL et ELL représentent les partenaires les plus fréquents de MLL et possèdent des domaines activateurs transcriptionnels alors que les partenaires de type cytoplasmique comme AF6 possèdent des domaines de dimérisation par hélices hydrophobes « coiled coil » induisant une dimérisation/oligomérisation de MLL. Les protéines obtenues par la fusion de MLL et de son partenaire côté c-terminal montrent une suppression du domaine PHD de MLL (Hess, 2004). Le pronostic des LAM avec réarrangements de MLL dépend de multiples facteurs : cellule d'origine de la transformation (CSH, CMP, GMP CLP...), type de réarrangement, mutations secondaires ou le microenvironnement (Basilico and Göttgens, 2017).

3. Les cellules souches leucémiques

a) Concept de cellules souches leucémiques

Les travaux sur les cellules souches ont permis des avancées majeures dans la compréhension du système hématopoïétique, son ontogénie et son homéostasie. Les CSH sont définies par leurs capacités d'auto-renouvellement et de multiples différenciations pour renouveler l'intégralité du système hématopoïétique et une régulation fine de ces processus est nécessaire pour l'homéostasie du système.

Plusieurs travaux sur des échantillons de LAM ont montré qu'il existe une hiérarchie dans l'expansion clonale avec une fraction minoritaire à sa tête qui maintient le développement leucémique. Le concept des cellules souches leucémiques a émergé après la description par l'équipe de J. Dick d'une sous-population leucémique aux propriétés semblables aux CSH et capables de greffer en série la leucémie à des souris immunodéficientes NOD/SCID : les cellules souches leucémiques (CSL), aussi appelées cellules initiatrices de leucémie (SCID leukemia initiating cells)(Bonnet and Dick, 1997). Dans ce travail, les auteurs ont observé que bien que les cellules CD34⁺⁺CD38⁺ soient capables de générer des colonies *in vitro*, elles ne sont pas capables de générer de LAM *in vivo*. Seules les cellules leucémiques CD34⁺CD38⁻ sont aussi bien capables de générer des colonies *in vitro* et transplanter la leucémie *in vivo*. De plus, leur travail estime la fréquence des CSL grâce à un test de dilution en série et greffe à des souris receveuses. Selon l'échantillon, la fréquence des CSL varie de 0,2 à 100 CSL/million de cellules mononuclées. Ce petit contingent de cellules à la tête de la hiérarchie leucémique pourrait être responsable des rechutes de la maladie observées chez plus de 60% des patients, bien que près de 70% des patients répondent positivement aux traitements de première ligne.

Si des évènements dérégulateurs tels que des mutations confèrent un avantage prolifératif, une capacité d'auto-renouvellement ou un blocage de la différenciation à une CSH ou un progéniteur, cela va affecter l'équilibre et conduire à une prolifération incontrôlée de blastes leucémiques non-fonctionnels, définition d'une leucémie.

b) Les CSL en quiescence

Les traitements actuels (chimiothérapies à base de cytarabine et d'anthracycline) visent principalement la prolifération rapide, caractéristique des blastes leucémiques. Cependant, les CSL peuvent être en quiescence comme cela a été démontré par des études où la greffe à des souris immunodéficientes est meilleure avec les CSL résistantes au 5-fluorouracil (5-FU), les cellules les plus quiescentes (Terpstra *et al.*, 1996). Un autre travail basé sur le suivi de cellules de LAM transduites par un lentivirus puis greffées en série a permis d'identifier une population CSL à division très lente (identifiée à partir des greffes tertiaires). Les CSL quiescentes pourraient être ainsi protégées des thérapeutiques qui visent majoritairement les cellules en cycle. La mise en cycle des CSL quiescentes par les cytokines est une des pistes thérapeutiques explorée (Ding, Gao and Zhang, 2017), par l'utilisation du G-CSF seul ou ensuite combiné à celle de la cytarabine, fludarabine et idarubicine (FLAG-IDA)(Burnett *et al.*, 2013). Ce protocole d'induction continue d'être appliqué dans certains centres hospitaliers avec une efficacité similaire aux traitements classiques.

c) Caractérisation phénotypique des CSL

L'étude des caractéristiques des CSL a fait appel à la cytométrie de flux pour distinguer les CSL des blastes ou des CSH par l'expression de marqueurs aberrants. La majorité des échantillons de LAM sont CD34+. Les premières études ont montré par greffes sériées chez des souris NOD/SCID ou en culture *in vitro* à long terme que les CSL étaient CD34+CD38- (Sutherland, Blair and Zapf, 1996). Des travaux plus récents, utilisant d'autres modèles murins (NOD/SCID/ IL2R- γ), plus permissifs à la xéno greffe, ont montré que, bien que présentes dans la fraction CD34+CD38-, les CSL peuvent exister dans la fraction CD34+CD38+ et même dans la fraction CD34- à des fréquences plus faibles (Sarry *et al.*, 2011).

Aucun marqueur spécifique des CSL n'a été identifié à ce jour. La difficulté réside dans l'hétérogénéité des LAM mais aussi dans la possibilité de distinguer des cellules leucémiques de cellules normales. En revanche certains marqueurs sont exprimés de façon aberrante dans les LAM comme le CD7, marqueur des lymphocytes T ou le CD11b qui marque les myéloïdes matures. D'autres marqueurs ont été identifiés comme surexprimés sur les CSL CD34+ CD38- dont

notamment le CD123, CD44, CD47 et d'autres (Ding, Gao and Zhang, 2017), notamment revus par Thomas et Majeti (Thomas and Majeti, 2017),

L'expression du CD123 est exprimé par 98% des CD34+CD38- ou CD34+CD38+ de 32 patients sur 34, comme le révèle l'étude phénotypique d'échantillons de LAM et corrèle avec leur capacité à greffer la LAM *in vivo* contrairement aux cellules CD123-. De plus, l'expression du CD123 est retrouvé notamment dans les LAM présentant des duplications internes en tandem du gène FLT3 (FLT3-ITD) suggérant que ce groupe de LAM pourrait être traité par des anticorps ciblant le CD123 (Al-Mawali, Gillis and Lewis, 2016).

25% des LAM sont CD34- et peuvent présenter des CSL transplantables. Des études de profils transcriptionnels et de capacité de greffe ont montré que les CSL 34- sont similaires aux CSL 34+ et que c'est la plasticité du CD34 qui serait aberrante (Quek *et al.*, 2016).

d) Métabolisme des CSL

Les cellules quiescentes ont un métabolisme ralenti car leur faible niveau d'activité ne requière pas beaucoup d'énergie. L'hypothèse est donc que les LSC ont un faible niveau de ROS qui peut être évalué par les marqueurs mitochondriaux. Une étude a rapporté que les CSL sont bien caractérisées par un faible niveau de ROS, qu'elles surexpriment BCL-2 (anti apoptotique) et que cibler BCL-2 est une stratégie de traitement permettant d'éliminer les LSC à faible ROS (Lagadinou *et al.*, 2013).

L'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) est une enzyme cytosolique responsable de l'oxydation intracellulaire des aldéhydes. Un haut niveau d'ALDH est associé au potentiel souche des cellules et il a été proposé qu'il soit également lié à la chimiorésistance des cellules souches. Une étude du groupe de D. Bonnet a validé le concept dans les CSH issues de cordon ombilical ainsi que dans des prélèvements de LAM, où l'activité de l'ALDH corrèle avec les CSL (Pearce *et al.*, 2005). Un second groupe a mis en évidence que les CSL ont un niveau d'activité d'ALDH inférieur aux CSH normales CD34+CD38- d'un même échantillon, permettant ainsi d'isoler séparément les CSH et les CSL pour développer de nouvelles stratégies spécifiques des CSL (Schuurhuis *et al.*, 2013).

4. Concept de cellules pré-leucémiques

Le terme préleucémique a évolué avec le temps et les découvertes. Il a d'abord été utilisé pour décrire l'état préleucémique des syndromes myéloyodysplasiques (SMD) qui évoluent vers la LAM dans près de 30% des cas, dites LAM secondaires (LAM-s). Avec le concept de cellules souches et l'observation que les SMD et AML ont une origine clonale, d'abord mise en évidence par les observations de l'inactivation du chromosome X chez les femmes puis grâce aux NGS, a émergé le concept d'une cellule préleucémique. Les NGS ont mis en évidence de nombreux gènes impliqués dans les SMD tels que TET2, SF3B1, ASXL1, SRSF2, EZH2, U2AF1, BCOR, RUNX1 et DNMT3A (Koef and Leong, 2017). Ces mutations ne semblent pas suffisantes à engendrer une véritable LAM. Des changements mutationnel ou chromosomique supplémentaires sont nécessaires pour évoluer vers la LAM-s. Les mutations retrouvées dans les LAM *de novo*, qui induisent des blocages majeurs de différenciation, mais non-impliquées directement dans les LAM-s sont nommées mutations drivers. Il s'agit pour principaux exemples de FLT3, NMP1, IDH1/2, NRAS/KRAS, CEBPA, WT1 et KIT. Gilliland et Griffin ont proposé un modèle où le développement leucémique nécessite 2 hits, c'est-à-dire 2 mutations associées pour transformer vers la LAM (Gilliland and Griffin, 2002). En parallèle, les travaux de Shlush et al ont trouvé dans les CSH purifiées au sein d'échantillons de LAM la présence de DNMT3A muté à haute fréquence allélique, sans présence de la mutation driver NMP1, présente seulement dans les blastes leucémiques (Shlush *et al.*, 2014). Ces CSH DNMT3A mutées ont un avantage de repopulation par rapport aux CSH non mutées dans les xénogreffes, sans générer de développement leucémique, confirmant leur identité préleucémique. Cependant sans second « hit » tel que NMP1, la mutation DNMT3A n'est pas transformante. Près de 90% des patients avec une LAM *de novo* ont une rémission morphologique complète, pourtant la mutation préleucémique persiste dans leur prélèvement de MO. Il serait alors intéressant d'associer les thérapeutiques visant la mutation préleucémique et celles visant la mutation driver pour éliminer les clones leucémiques et préleucémiques en même temps pour prévenir la rechute.

5. Interactions des CSL avec la niche hématopoïétique

Comme pour les CSH, les CSL sont dépendantes du microenvironnement qui les protège et assure leur maintien en quiescence. Ainsi le microenvironnement serait en partie responsable de la chimiorésistance des CSL en les faisant bénéficier des signaux d'autorenouvellement, de homing, de quiescence et de toutes les cytokines présentes au sein de la niche, au même titre que les CSH. Cependant les CSL diffèrent des CSH par la dérégulation des interactions et des signaux régulant leur prolifération et leur capacité d'invasion (Peled and Tavor, 2013). Le microenvironnement leucémique est une cible potentielle pour atteindre les CSL et limiter les rechutes.

Par exemple, les CSL expriment le CXCR7 en plus du CXCR4, récepteurs impliqués dans l'adhésion et la migration en réponse au CXCL12, alors que les CSH expriment le CXCR4 mais peu de CXCR7, ce qui favorise le maintien des CSL au sein de la niche (Edward Allan R Sison and Patrick Brown, 2011). Des inhibiteurs de CXCR4 peuvent être utilisés pour induire la mobilisation des CSL et mieux les exposer aux chimiothérapies. Il a été montré que les CSL vont greffer dans la MO dans la région endostéale (Ishikawa *et al.*, 2007) où les molécules d'adhésion comme le CD44 y sont également importantes. Une inhibition *in vivo* du CD44 par un anticorps monoclonal dans un modèle de xénogreffe induit une diminution du nombre de cellules leucémiques et leur capacité de greffe sériée (Jin *et al.*, 2006). La revue très complète et publiée par Shafat et Al en 2017 détaille les interactions connues entre les cellules leucémiques et leur niche et en particulier les composants cellulaires de cette niche (Shafat *et al.*, 2017), peut être résumée par la figure 14 ci-après. Il existe trois façons de viser les cellules leucémiques en agissant sur les fonctions de support fournies par la niche : cibler l'angiogénèse, le métabolisme énergétique et les capacités de migration.

Les études précliniques et cliniques ont démontré le bénéfice apporté par des traitements ciblant CXCR4 (TN140, AMD3100, AMD3465, MDX-1338)(Tabe and Konopleva, 2014).

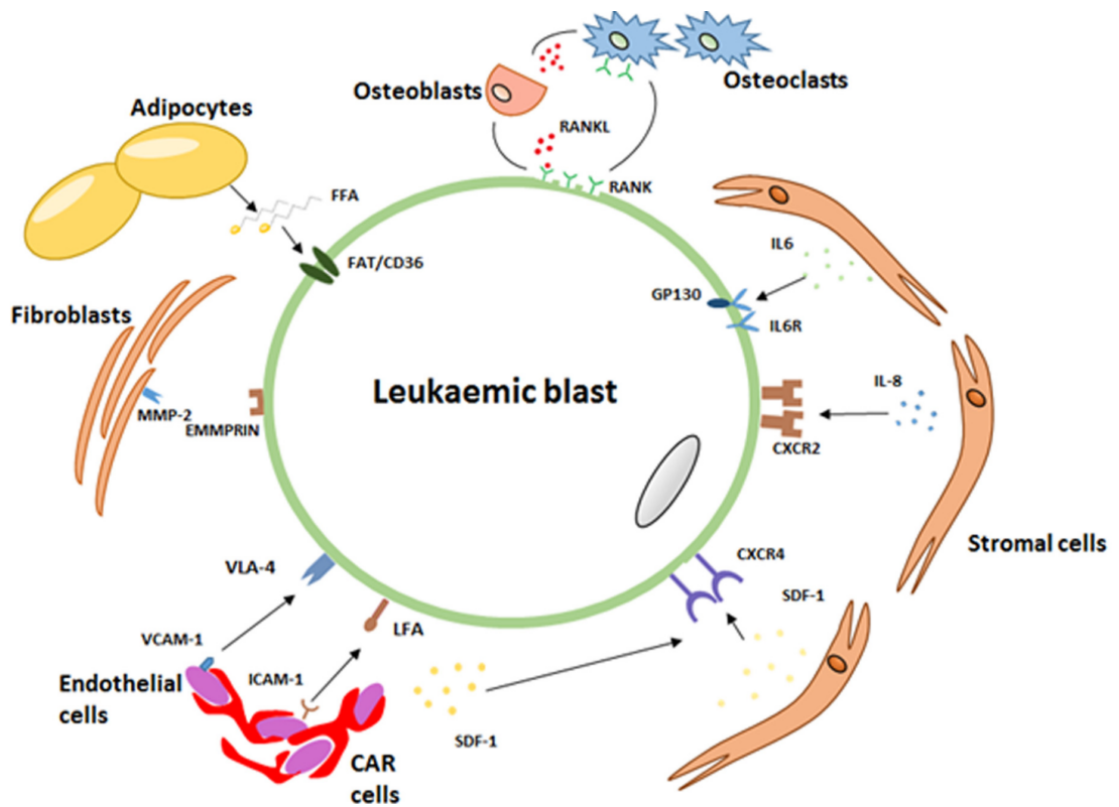
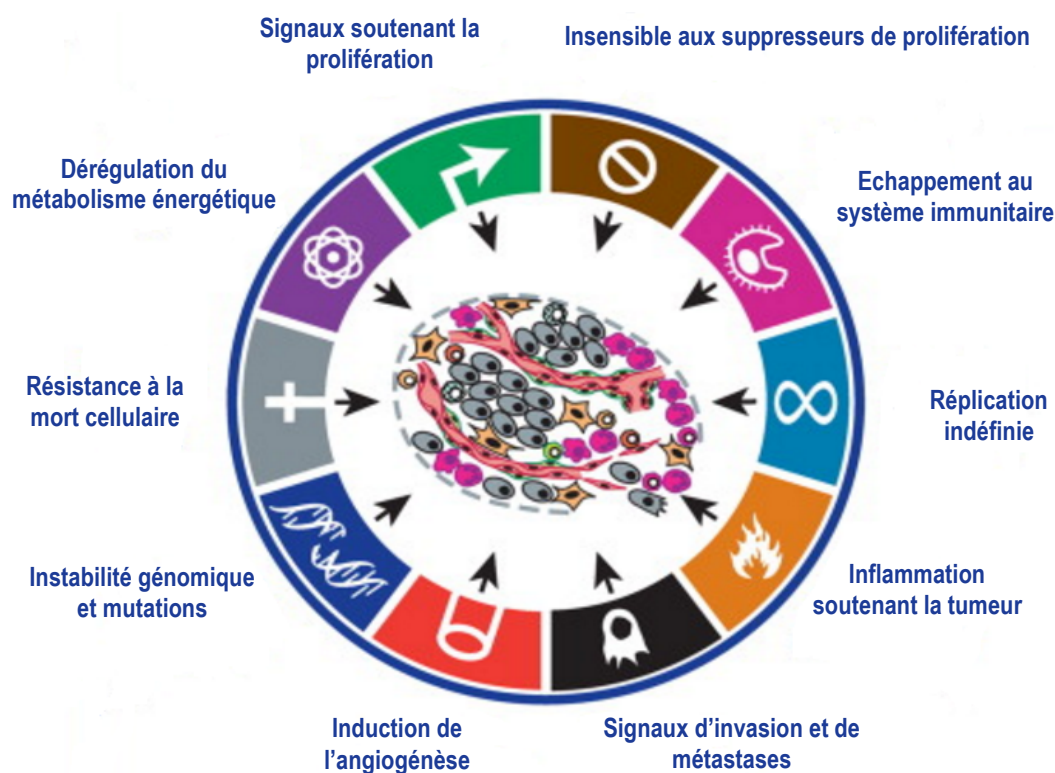


Figure 14 : Les interactions des cellules leucémiques avec leur microenvironnement supportent leur maintien et leur prolifération aux dépens des cellules hématopoïétiques normales (Shafat et al., 2017)

Chapitre 4 : Dérégulation des voies de signalisation de l'hématopoïèse

En 2000, Hanahan et Weinberg ont proposé une structure récapitulative décrivant les six détournements emblématiques des processus de contrôle cellulaire par les cellules cancéreuses. Leur travail, réévalué et étendu par eux-mêmes en 2011, a ajouté quatre autres caractéristiques pour compléter le tableau (figure 15) et soulignant que l'instabilité génomique peut être à l'origine de plusieurs des caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses. De plus, ils mettent en avant la notion de complexité du microenvironnement tumoral. En effet si la cellule souche cancéreuse est la graine du cancer, le microenvironnement est son terreau.

Figure 15 : "Hallmarks of cancers" version 2011, schéma décrivant les axes biologiques détournés par la cellule cancéreuse



1. Voies de signalisation impliquées dans la survie

a) Wnt

La voie Wnt (Wingless-related integration site) produit 19 glycoprotéines riches en cystéine, sécrétées dans la matrice extracellulaire. La voie canonique de

Wnt est activée par la liaison d'un ligand Wnt (tel que Wnt 1, Wnt 3A et Wnt 8) à un récepteur à protéine G de la famille Frizzled (Fz) et à un co-récepteur de la famille des récepteurs de low-density lipoprotein (LRP5 ou 6). Il y a alors déconstruction d'un complexe de molécules de signalisation intracellulaire (dont CK1 α , APC, GSK3 β) nommé complexe de dégradation et perte de leur interaction avec la β -caténine phosphorylée. La β -caténine hors du complexe n'est plus phosphorylée et s'accumule dans le cytoplasme, ce qui permet la transduction du signal par sa translocation dans le noyau. Elle entre en compétition avec les co-répresseurs de la famille GRG (groucho-gene related) pour lier les facteurs de transcription TCF/LEF (T cell factor/lymphoid enhancer factor) et former un complexe permettant la transcription de gènes cibles tels que c-Myc, c-Jun ou cyclin D1 (figure 16, (Duchartre, Kim and Kahn, 2016)) qui œuvrent en faveur de la prolifération et la survie.

En parallèle, les glycoprotéines Wnt peuvent amorcer d'autres mécanismes indépendants de β -caténine et constituer ainsi deux voies non-canoniques de Wnt. La voie de polarité planaire implique des ligands Wnt tels que Wnt 5A ou Wnt 11 et de petites protéines G telles que RhoA, RAC et Cdc42 pour contrôler le cytosquelette, l'adhésion ou la migration cellulaire. La seconde voie non-canonique est la voie Wnt dépendante du calcium qui utilise des récepteurs de Wnt alternatifs RYK et ROR et participe à la migration cellulaire. Une autre hypothèse propose que les voies canoniques et non-canoniques soient interdépendantes et forment en réalité une voie Wnt « intégrée ».

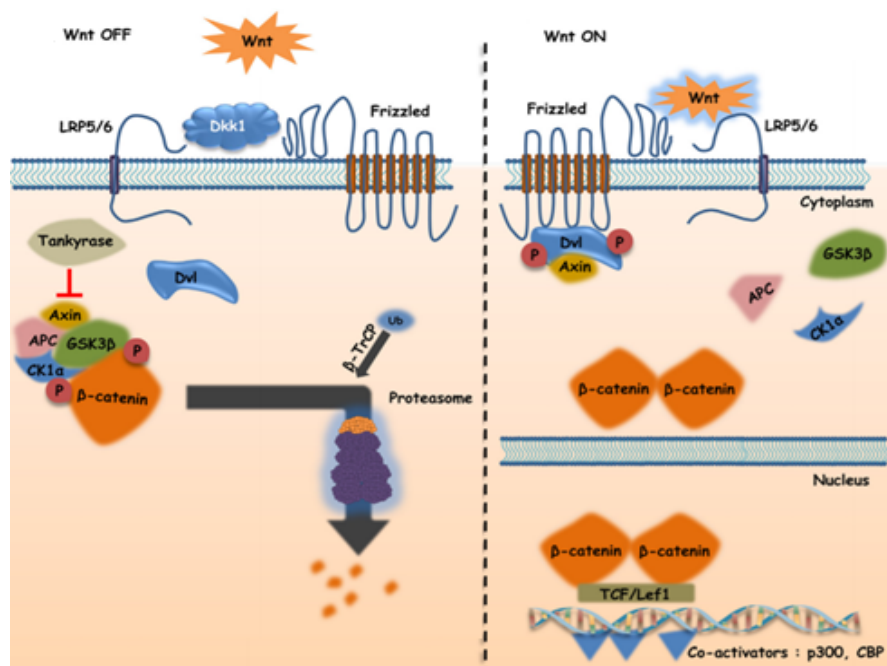
La voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans de nombreux cancers dont notamment les cancers colorectaux où on retrouve des mutations du gène APC qui entraîne l'accumulation de la β -caténine et l'activation des gènes de prolifération. Le rôle de Wnt au sein de la niche est très controversé car des équipes ont montré qu'elle n'est pas indispensable à l'hématopoïèse adulte alors des travaux démontrent au contraire que la voie Wnt est exprimée de façon importante au sein de la moelle osseuse où elle joue rôle majeur dans l'autorenouvellement et la survie des CSH (Lane, Scadden and Gilliland, 2009)(Luis *et al.*, 2012)(Kabiri *et al.*, 2015). Dans des conditions physiologiques, l'expression de l'inhibiteur de Wnt Dickkopf1 (DKK1) par les ostéoblastes induit une perte des propriétés souches et une différenciation incontrôlée des CSH (Fleming *et al.*, 2008).

Dans le même sens, l'activation de Wnt dans le stroma induit l'activation de la voie Notch qui participe à l'auto-renouvellement des CSH. De nombreux travaux ont montré que le développement leucémique est soutenu par la voie Wnt dans les LAM et dans les LMC . Dans les modèles murins de LAM induite par la co-expression des oncogènes HOXA9 et MEIS1 par l'intermédiaire du gène de fusion MLL-AF9, l'autorenouvellement des CSL nécessite les signaux Wnt. Il est probable de la complexité des différentes voies dépendantes de Wnt ainsi que l'intervention de nombreux acteurs du microenvironnement n'aient pas encore permis d'élucider tous les rôles de Wnt dans la leucémogénèse.

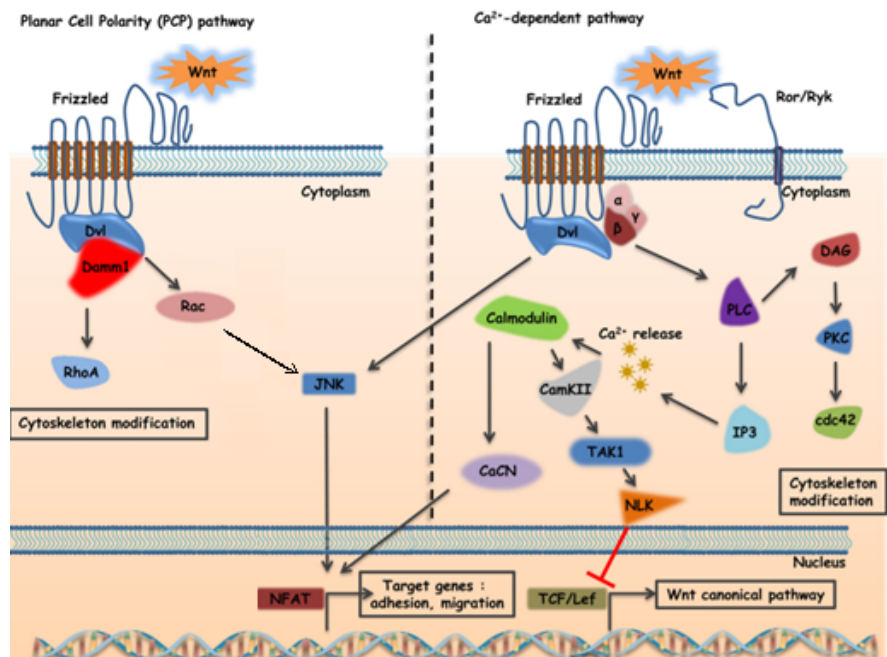
Figure 16 : Les différentes signalisations contrôlées par Wnt.

Duchartre et al. 2016

La voie canonique de Wnt en mode ON ou OFF, qui régule la stabilité de la B-caténine,



La voie de polarité planaire et la voie dépendante du calcium.



b) PI3K/AKT/mTor

La famille du phosphatidyl inositol 3 kinase est une large famille de kinases classées en trois groupes (IA/IB, II et III) qui se distinguent par leur structure, leurs substrats lipidiques, leurs fonctions, leurs distributions tissulaires et leurs mécanismes d'action. Leur activité kinase phosphoryle les phosphoinositides en position 3 du noyau inositol. Elles ont été mises en évidence dans de très diverses fonctions biologiques telles que la quiescence, la prolifération, la différenciation, la motilité, la survie et le trafic intracellulaire et sont fréquemment retrouvées dérégulées dans les cancers.

Activées par les facteurs de croissance via les récepteurs TK, les PI3K convertissent le phosphatidylinositol en une cascade qui aboutit au phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate : PIP3 qui permet de le recrutement à la membrane de nombreuses protéines de signalisation dont les protéines à domaines PX, à domaines PH (pleckstrin homology) ou à domaines doigt de zinc FYVE.

Les produits de phosphorylation des PI3K permettent notamment de recruter AKT (protéine kinase B) et la PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) à la membrane plasmique via leur domaine PH. L'interaction d'AKT et PDK1 va permettre la phosphorylation d'AKT par PDK1 et une activation partielle d'AKT. AKT sera pleinement activé après phosphorylation par le complexe mTORC2. AKT sera alors le point de départ d'une cascade d'activation permettant la survie et la prolifération par de multiples voies. En effet la littérature rapporte plus de cent substrats distincts d'AKT dont les principaux sont FOXO, GSK3, TSC2, RAF1 et caspase 9 qu'il inhibe, ainsi que MDM2 et IKK qu'il active. L'activation de la voie PI3K/Akt est finement régulée notamment par des phosphatases telles que PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue) ou SHIP-1 (SH2 domain containing inositol phosphatase-1) capables de déphosphoryler PIP3 en PIP2 (Piddock, Bowles and Rushworth, 2017).

Les dérégulations de la voie PI3K/AKT sont très fréquentes dans les LAM, une activation de cette voie est retrouvée chez plus de 60% des patients et associée à un mauvais pronostic. Les récepteurs TK peuvent fonctionner de façon aberrante et notamment l'IGF1-récepteur ou en réponse au VEGF (Torres-Arzayus *et al.*,

2004). De nombreux inhibiteurs d'AKT tels que le CAL-101, le MK2206 et l'AZD5363 ont été proposés pour le traitement des LAM et montrent un effet antiprolifératif ou une sensibilisation aux chimiothérapies dans les modèles précliniques. La rapamycine et ses analogues sont des inhibiteurs de mTor, présent dans les complexes mTORC1 et mTORC2, qui ont montré une activité anti-leucémique en combinaison avec l'étoposide dans les modèles murins de LAM (Xu, Thompson and Carroll, 2009). Cependant, l'utilisation combinée des analogues de la rapamycine et des chimiothérapies n'a pas montré de meilleure efficacité que les chimiothérapies seules en essais cliniques. Les interactions récepteurs TK/PI3K/AKT sont nombreuses et complexes et suggèrent l'utilisation simultanée d'inhibiteurs de plusieurs acteurs de cette voie et en particulier des anticorps ciblant les récepteurs TK, déjà utilisés en clinique, avec des inhibiteurs de PI3K ou AKT.

c) HedgeHog (HH)

La voie Hedgehog est impliquée dans le développement dès la vie embryonnaire où elle régule la prolifération et la différenciation. Les mammifères ont trois homologues à Hedgehog HH : Sonic Hedgehog SHH, Desert Hedgehog DHH et Indian Hedgehog IHH (Berman *et al.*, 2003; Thayer *et al.*, 2003; Watkins *et al.*, 2003; Karhadkar *et al.*, 2004). Les ligands HH lient les récepteurs Patched 1 et 2 (Ptch) pour lever l'inhibition de Smoothened (Smo) qui est couplé aux récepteurs à protéines G. Smo libéré de l'inhibition de Ptch conduit à l'activation des facteurs de transcription de la famille Gli. La voie Hedgehog est activée de façon aberrante dans de multiples cancers. Les investigations menées sur les lignées leucémiques ainsi que sur des LAM primaires ont montré une activation de cette voie et son implication dans le maintien des CSL CD34+. En revanche, la voie HH n'est pas nécessaire au développement de LAM induite par MLL-AF9 alors qu'elle est nécessaire au maintien des CSL des LMC où la déplétion de Smo cause la déplétion des CSL. Dans les lignées où elle est exprimée (Kasumi, TF-1), la voie HH est impliquée dans la régulation de transporteurs de drogues, de BCL2 et de BCLxl (anti-apoptotiques) (Kobune *et al.*, 2009). Le facteur de transcription de cette voie, GLI2, est surexprimé dans certaines LAM avec mutations FLT3 ITD (Lim *et al.*, 2015).

d) JAK/STAT

JAK2 fait partie de la famille des Janus Kinases (JAK), tyrosine kinases cytoplasmiques. Elle est impliquée dans la transduction de signaux dépendants des facteurs de croissance. L'activation de la voie JAK/STAT est un marqueur des néoplasmes myéloprolifératifs aboutissant une hypersensibilité ou une indépendance aux cytokines. Les mutations gain de fonction de JAK2 sont moins fréquentes dans les LAM, environ 3% des LAM *de novo* (Vicente *et al.*, 2007). Cependant, des travaux ont démontré une activation fréquente de STAT3 dans les LAM *de novo*, probablement conduite par d'autres évènements oncogéniques telles que les translocations (8 ;21) ou les mutations FLT3 ITD (Steensma *et al.*, 2006). Le ciblage de STAT3 en combinaison avec les chimiothérapies peut se montrer intéressant dans la mesure où une étude a montré que l'activation de STAT3 est corrélée à la résistance aux drogues.

e) RAS/MAPk

Les MAP kinases (Mitogen-activated protein) sont des sérines thréonines kinases très conservées au cours de l'évolution et d'expression ubiquitaire mais leurs activités diffèrent selon des stimuli spécifiques. Six branches de MAPk ont été identifiées : ERK-1 et -2 (extracellular signal-regulated kinase), JNK-1, -2 et -3 (c-jun aminoterminal kinase), p38, ERK-3 et -4, ERK-5 et -6 et enfin ERK-7 et -8. Chaque groupe de MAPK est activé par une cascade de phosphorylation qui lui est propre, suivant une organisation hiérarchisée. Ainsi, les MAPK sont activées et phosphorylées par les MAPKK qui sont elles-mêmes phosphorylées par les MAPKKK généralement activées par phosphorylation.

L'activation de récepteurs à TK va recruter des protéines adaptatrices telles que Shc ou le complexe Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2)/SOS-1 (son of sevenless) et permettre l'activation de Ras, une petite protéine G à activité GTPase (Li *et al.*, 1994). Une fois activée, Ras recrute à la membrane plasmique la protéine MAPKKK effectrice Raf. Raf va activer ses effecteurs MAPKK MEK-1 et 2 qui vont à leur tour phosphoryler leurs cibles ERK-1 et -2. ERK-1 et -2 sont ubiquitaires et participent à la prolifération et la survie ainsi que la différenciation granulomonocytaire.

La voie RAS/MAPK régule des fonctions clés dans la cellule et des altérations sont observées dans de nombreux cancers. Concernant les LAM, la voie MAPK est constitutivement activée dans la majorité des LAM, de 50 à 83% selon les études. Cela est confirmé par l'inhibition de MEK1 qui entraîne une apoptose des blastes LAM (Lunghi *et al.*, 2003). Cette activation constitutive est due à différents facteurs pour la plupart impliqués également dans l'activation de la voie PI3K/Akt : mutations des récepteurs FLT3, Kit ou des mutations RAS. Les protéines N-RAS et K-RAS sont mutées respectivement dans 25 et 15% des échantillons primaires de LAM (Reuter, Morgan and Bergmann, 2000).

f) CXCR4/CXCL12

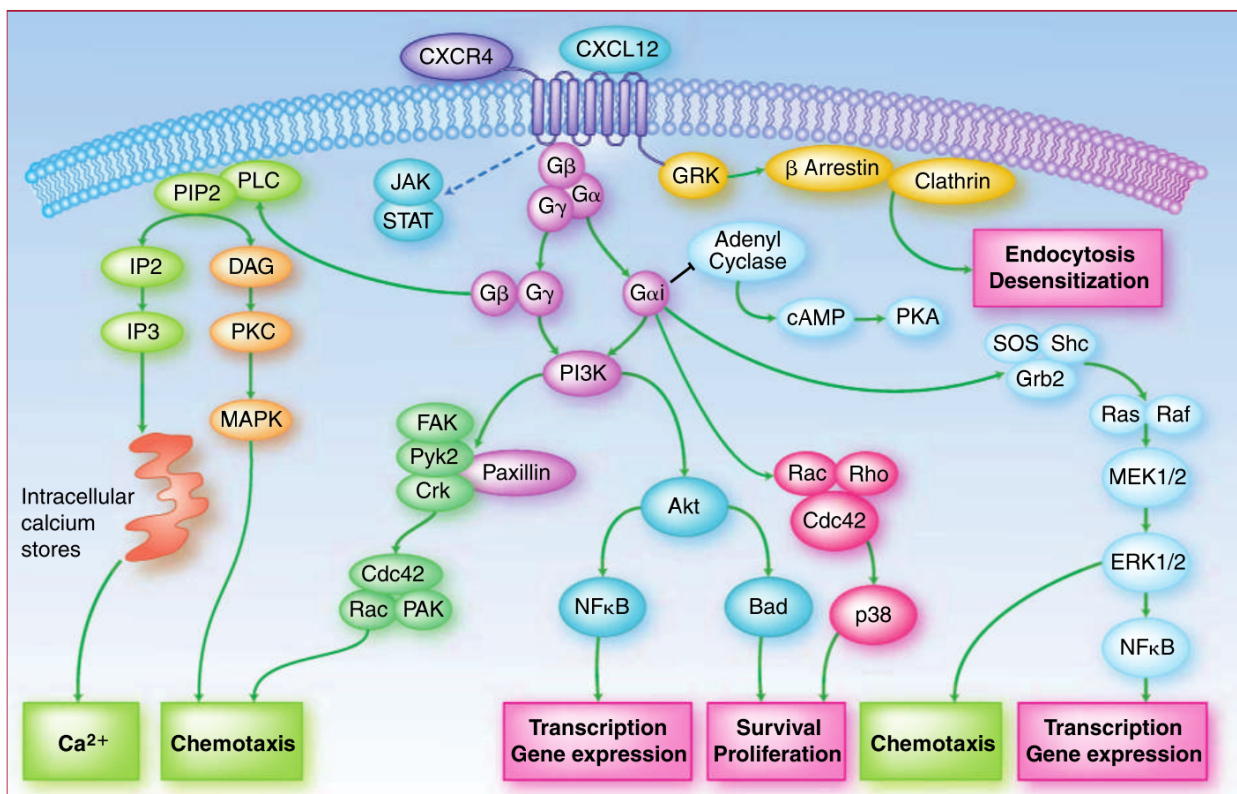
Le récepteur CXCR4 a été identifié en 1996 comme cofacteur du VIH, permettant la fusion du virus avec ses cellules cibles. L'identification de son ligand, la chimiokine CXCL12 (SDF-1) a permis de le classer dans les récepteurs à chimiokines. Les chimiokines sont des cytokines chimio-attractantes qui vont lier des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G pour réguler le trafic cellulaire, la réponse immunitaire et l'adhésion.

Des modèles murins invalidés pour CXCR4 ou CXCL12, létaux au stade embryonnaire, ont montré les rôles essentiels que jouent ces gènes dans la mise en place du système hématopoïétique embryonnaire ainsi que dans la vascularisation, le cœur et le cerveau (Ratajczak *et al.*, 2006). Le CXCL12 est produit constitutivement par différents organes dont les poumons, le foie, le muscle squelettique, le cerveau, les reins, le cœur, la peau, la rate et la moelle osseuse dont les ostéoblastes, les cellules endothéliales et les cellules réticulaires. Le CXCL12 est produit également en réponse à l'hypoxie et aux atteintes tissulaires (irradiation, chimiothérapie, blessure) par les cellules endothéliales et péricytaires (Fiegl *et al.*, 2009). Parallèlement, le récepteur CXCR4 est aussi présent sur ces mêmes nombreux tissus et sur les cellules hématopoïétiques dont notamment les CSH, les lymphocytes T et B, les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles. Le couple CXCR4/CXCL12 est nécessaire au homing ou « nichage », c'est-à-dire au retour au sein de la MO des CSH. La diminution de CXCL12 ou l'utilisation d'inhibiteurs de CXCR4 tels que le G-CSF, l'AMD3100 ou le TN140 vont interrompre le homing et les CSH seront retrouvées dans le sang périphérique. Les

travaux de Sugiyama ont également démontré l'importance de l'axe CXCR4/CXCL12 dans le maintien du pool de CSH en utilisant des souris où CXCR4 est délété conditionnellement dans la moelle osseuse (Sugiyama *et al.*, 2006). L'utilisation de ce modèle a montré que l'absence de CXCR4 promeut la sortie de phase G₀ et l'entrée en G₁ menant à une expansion de progéniteurs plus différenciés et donc une réduction du pool de CSH. Sugiyama a également utilisé des souris knock-in CXCL12-GFP et l'imagerie pour montrer l'importance de la proximité entre les cellules productrices de CXCL12 et les CSH.

Les LAM montrent une expression hétérogène de CXCR4 à la membrane et plusieurs groupes ont démontré significativement la corrélation entre mauvais pronostic et expression élevée de CXCR4 (Spoo *et al.*, 2007). Des dérégulations de voies de signalisation en amont de CXCR4 peuvent participer à l'augmentation de son expression en surface comme dans le cas des LAM avec mutations FLT3-ITD ou fusions ETV6. Les LAM exploitent différentes voies de signalisation pour permettre leur survie et leur prolifération, l'axe CXCR4/CXCL12 y participe parfaitement par ses capacités à activer les voies PI3K/AKT, MAPK ou l'activation de BCL-xl anti-apoptotique (figure 17) (Y Zhang *et al.*, 2012)(Chen *et al.*, 2013).

Figure 17 : schématisation des voies de signalisation intracellulaires régulées par l'axe CXCR4/CXCL12 d'après B.Teicher et S.Fricker (2010)



➤ **CXCR4 et autres ligands**

Il a longtemps semblé que CXCL12 était le seul ligand de CXCR4, en faisant un récepteur monogame, exceptionnel parmi les autres récepteurs de chimiokines. Des travaux récents ont montré que CXCR4 interagit avec d'autres ligands :

➤ **CXCR4/MIF**

MIF est la première cytokine à avoir été décrite en 1966 pour son rôle d'inhibition de la migration des macrophages mais ses fonctions et interactions sont restées méconnues pendant plusieurs décennies. L'activité de la poche catalytique de MIF en N-ter montre notamment une activité tautomérase qui participerait à l'activité inflammatoire de MIF mais de manière non-élucidée. Un modèle murin mutant pour le site catalytique N-ter a montré l'importance de ce site dans les interactions protéine-protéine de MIF mais non nécessaire à son activité cytokine. Le récepteur canonique de MIF est le CD74 (HLA-DR). En 2007, une étude a identifié MIF comme ligand non classique des récepteurs CXCR2 et CXCR4 via la formation de complexes de récepteurs dimériques CXCR2/CD74 et CXCR4/CD74 capables de promouvoir l'athérogénèse (Bernhagen *et al.*, 2007).

➤ **CXCR4/ubiquitine**

En 2010, des travaux ont mis en lumière l'ubiquitine extracellulaire comme ligand potentiel du récepteur CXCR4 (Saini, Marchese and Majetschak, 2010). L'ubiquitine extracellulaire, beaucoup moins étudiée que l'ubiquitine intracellulaire, a montré dans des modèles *in vivo* des propriétés anti-inflammatoires et de régulation leucocytaire. CXCR4 est ubiquitiné de manière agoniste-dépendante à la membrane plasmique et nécessite la phosphorylation préalable du récepteur par GRK6 et/ou PKC δ suite à l'activation du récepteur par son (ses) ligand(s). L'utilisation de récepteurs CXCR4 mutants a montré que l'ubiquitination de CXCR4 par l'enzyme E3 ubiquitine-ligase AIP4 s'effectue sur les résidus sérine 324 et 325. AIP4 est une E3 ligase de la famille Nedd4-like décrite dans la différenciation érythroïde et lymphoïde et la régulation immunitaire. AIP4 est également impliquée dans l'ubiquitination de c-FLIP (anti-apoptotique, inhibitrice de caspase 8) et sa dégradation protéasomale. Une étude très récente montre que l'ubiquitination de CXCR4 est promue par la protéine MIM (missing-in-metastasis, ou MTSS1) en formant un complexe avec AIP4 (Li *et al.*, 2017). Une

surexpression de MIM induit l'inhibition des réponses de CXCR4 à CXCL12, l'accumulation de corps vésiculaires dans le cytoplasme et l'internalisation de CXCR4.

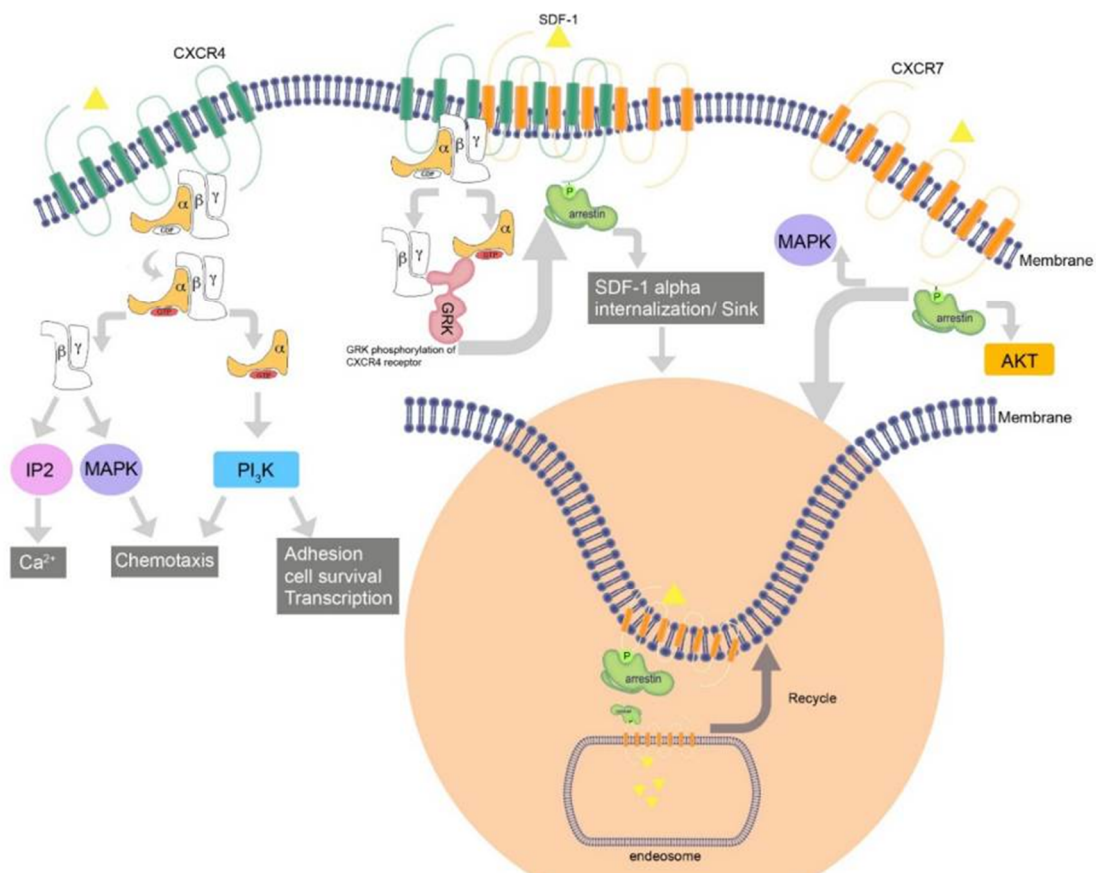
➤ **La dualité CXCR4 et CXCR7**

Durant de nombreuses années, le couple CXCR4/CXCL12 était considéré comme un couple monogame. Nous avons vu que CXCR4 est capable de lier d'autres ligands mais il faut aussi noter que CXCL12 est capable de se fixer avec une haute affinité à un autre récepteur : le CXCR7 (Balabanian *et al.*, 2005). Comme CXCR4, CXCR7 lie le CXCL12 par son domaine N-terminal et son expression est relativement ubiquitaire bien que son spectre d'expression soit controversé. CXCR7 est un récepteur aux chimiokines atypique, incapable de signaler via les protéines G. CXCR7 est exprimé par de nombreux types de cancers et est essentiel pour la survie et la croissance des cellules tumorales mais n'est pas impliqué directement dans la migration (Burns *et al.*, 2006). L'utilisation de modèles animaux KO pour CXCR7 a montré que les actions de CXCR7 et CXCR4 ne sont pas redondantes car, bien que les délétions de l'un des deux gènes soit létale, les atteintes des organes observées sur les fœtus ne sont pas les mêmes. La délétion de CXCR7 chez la souris entraîne la mort périnatale des petits, présentant principalement des atteintes cardiaques avec une atteinte endothéliale, des défauts du septum ventriculaire et des malformations des valves cardiaques (Sierro *et al.*, 2007). Les différentes données de la littérature proposent que les fonctions de CXCR7 soient médiées par différents mécanismes. Tout d'abord, il a été montré par des techniques de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) que CXCR4 et CXCR7 peuvent s'hétérodimériser (Levoye *et al.*, 2009). Cet hétérodimère permet le recrutement de la β -arrestine et l'activation des voies de signalisation β -arrestine-dépendantes (Décaillot *et al.*, 2011). Ensuite, par une action de collecte de CXCL12 comme un « siphon », séquestrant le CXCL12 disponible et donc limitant l'action de CXCR4 (Wang *et al.*, 2012)(Uto-Konomi *et al.*, 2013) ou bien au contraire permettant d'améliorer la migration via CXCR4 en limitant l'internalisation de ce dernier (Sánchez-Alcañiz *et al.*, 2011). Ces différentes sont résumées schématiquement dans la figure 18. Il avait été démontré que la signalisation dépendante de CXCL12 active la voie Akt/mTOR/FoxO3 et inhibe la voie du TGF- β pour promouvoir la mise en cycle des progéniteurs CD34+

(Chabanon *et al.*, 2008). Récemment il a été mis en évidence que le CXCR7 participe à la signalisation du CXCL12 car l'inhibition de CXCR7 empêche l'activation d'Akt CXCL12-dépendante et diminue la mise en cycle, la survie et la capacité à former des colonies des progéniteurs CD34+ (Torossian *et al.*, 2014).

Il est important de prendre en compte ces données récentes sur CXCR7 lors de l'étude des mécanismes régulés par CXCR4 car on ne peut exclure que les effets observés soit, au moins en partie, dus à CXCR7 ou le complexe CXCR4/CXCR7.

Figure 18 : représentation schématique des voies modulées par CXCR4, CXCR7 ou le complexe CXCR4/CXCR7 (Asri *et al.*, 2016).



2. Voies d'apoptose

L'apoptose est le suicide programmé de la cellule, physiologique et essentiel à l'homéostasie des différents tissus. Il existe deux voies d'apoptose : la voie intrinsèque dépendante de la mitochondrie et la voie extrinsèque qui implique les récepteurs de mort. Les traitements par chimiothérapies des LAM ont pour but d'induire la mort cellulaire par apoptose mais les dérégulations de l'apoptose dans

les LAM et d'autres cancers a poussé la recherche à se pencher sur ces mécanismes.

a) Apoptose intrinsèque ou mitochondriale

L'apoptose intrinsèque est médiée au sein de la mitochondrie suite à divers stress cellulaires et dépend principalement des membres de la famille BCL-2. La famille BCL-2 compte de nombreux membres régulateurs qui ont des propriétés pro- ou anti-apoptotiques qui régulent les membres effecteurs de cette famille : Bax et Bak. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont les protéines à multi-domaines (BH1, BH2, BH3, BH4) Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xl, MCL1 et A1. Ils protègent la cellule en bloquant les effecteurs Bax et Bak (Testa and Riccioni, 2007).

Les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont les protéines à domaine BH3-seul tels que Bim, Bid, Bad, Puma et Noxa. Ils sont finement régulés par les facteurs de transcription en réponse aux dommages à l'ADN ou la privation de cytokines par exemple et fonctionnent comme des capteurs de signaux pro-apoptotiques. Pour les bloquer, ces protéines peuvent être phosphorylées et séquestrées en réponse aux voies de survie telles que PI3K/AKT ou MAPKinase. Ils tiennent le rôle clé d'activateurs de Bax et Bak, les effecteurs, pour déclencher l'apoptose (Adams, 2003), (figure 19). Les protéines anti- et pro-apoptotiques s'antagonisent mutuellement pour contrôler l'apoptose. Le déséquilibre entre les deux fonctions de cette famille entraîne ainsi soit la mort soit la survie de la cellule.

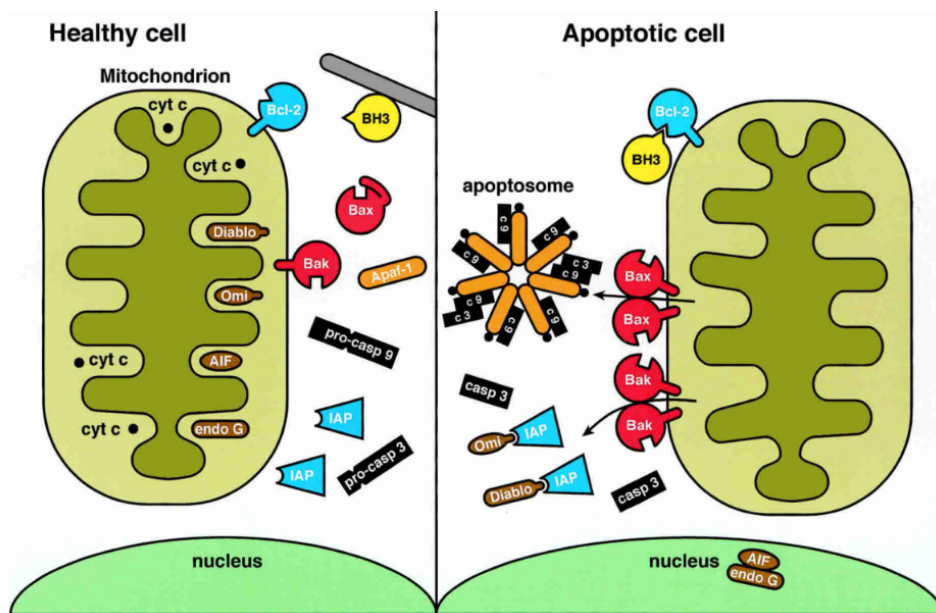


Figure 19 : La voie d'apoptose mitochondriale. Le déclenchement de l'apoptose entraîne la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et le relargage du cytochrome c et la formation de l'apoptosome. Issue d'Adams, 2003.

b) Apoptose extrinsèque : les récepteurs de mort

Les récepteurs de mort sont des récepteurs transmembranaires qui sont caractérisés par la présence d'un domaine de mort dans le compartiment intracellulaire et capable d'interactions protéine-protéine. Ils font partis de la superfamille des récepteurs TNF (tumor necrosis factor receptor) et sont divisés en deux branches selon le recrutement provoqué par leur activation : FADD (Fas-associated Death Domain) ou TRADD (tumor necrosis factor receptor -associated death domain) (Wilson, Dixit and Ashkenazi, 2009).

c) Les caspases

Elles sont les protéases effectrices de l'apoptose par clivage de motifs spécifiques. Elles sont synthétisées sous forme inactive et l'activation des caspases initiatrices (caspase 9 pour l'apoptose intrinsèque et caspase 8 pour l'apoptose extrinsèque) entraîne la cascade de caspases effectrices et en particulier les caspases 3 et 7. Une fois activées, les caspases effectrices clivent un très grand nombre de substrats (près de 300 identifiés) dont des protéines du cytosquelette, de structure nucléaire, de réparation de l'ADN, des kinases et des protéines du cycle cellulaire, ce qui les inhibe ou entraîne la dégradation de la plupart de ces cibles (Chumsri, Matsui and Burger, 2007).

d) Dérégulation des voies d'apoptose dans les LAM

L'équilibre gérant la survie ou la mort est évidemment la cible des dérégulations touchant de nombreuses pathologies dont le cancer. La résistance à la mort cellulaire est l'une des branches du « Hallmarks of cancers ».

Dans le contexte des LAM, une surexpression de BCL2, anti-apoptotique, a été observée et peut être associée aux anomalies de RUNX1/RUNX1T1 retrouvées dans les lignées Kasumi et SKNO (Klampfer *et al.*, 1996). Des anticorps BH3 mimétiques sont développés dans l'optique de bloquer BCL2 et BCL-x. Par ailleurs, l'analyse de 256 cas de LAM par cytométrie en flux a montré que BCL2 est surexprimé dans les LAM associées à un mauvais pronostic. L'expression d'Apaf-1, nécessaire à la formation de l'apoptosome, est inhibée par méthylation de son promoteur dans certaines lignées cellulaires ainsi que pour 42% (5 sur 12 LAM) échantillons de LAM (Furukawa, 2005). Cette inhibition peut être restaurée par l'utilisation d'agents déméthylants (azacytidine). Une absence ou une faible expression de

FADD, l'adaptateur principal de la voie d'apoptose des récepteurs de mort FAS et TRAIL, analysée par western blot et immunohistochimie est retrouvée sur près de 60% des 70 échantillons de LAM, est également associée à un mauvais pronostic et prédictive de résistance à la chimiothérapie (Tourneur *et al.*, 2004). D'autres pistes de résistance à l'apoptose dépendante de TRAIL ont été étudiées, par exemple 20% des LAM *de novo* de 92 patients montre une augmentation d'expression membranaire de TRAIL-R3, anti-apoptotique, analysée par cytométrie en flux, qui est associée à une survie diminuée (Chamuleau *et al.*, 2011). La caspase 8, initiateur de l'apoptose via les récepteurs de mort, possède plusieurs isoformes dont la caspase 8L à laquelle il manque le domaine catalytique et qui inhibe la caspase 8 en titrant les adaptateurs FADD. Les CSH CD34+ ainsi que les LAM indifférenciées (M0 et M1) expriment l'isoforme caspase 8L de façon prédominante (Mohr *et al.*, 2005).

Chapitre 5 : Régulation des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules hématopoïétiques

Le métabolisme aérobie permet une production efficace d'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) via les chaînes de transports d'électrons au sein de la membrane interne mitochondriale mais génère aussi des espèces réactives de l'oxygène (ROS). ROS est un terme générique qui regroupe toutes les espèces de l'oxygène plus réactives que l'oxygène libre. Les radicaux superoxydes (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxyles (OH^-) et les singlets d'oxygènes (O^-) sont les principaux ROS. Ils sont à l'origine de la peroxydation d'acides nucléiques, de lipides, d'acides aminés et de glucides. Une concentration physiologique de ROS joue un rôle dans les voies de signalisations (D'Autréaux and Toledano, 2007; Schieber and Chandel, 2014), mais à de fortes concentrations les ROS peuvent oxyder les constituants cellulaires conduisant à la sénescence, l'activation des voies d'apoptose ou la carcinogénèse (Yahata *et al.*, 2015). La surexpression de l'enzyme anti-oxydante superoxyde dismutase (SOD) chez la drosophile prévient le vieillissement des cellules souches germinales et augmente leur prolifération, suggérant que les ROS participent directement au vieillissement cellulaire (Pan *et al.*, 2007).

1. Origine des espèces réactives de l'oxygène

Les ROS sont produites par la respiration oxydative de la mitochondrie ou en réponse au stress environnemental (radiations ionisantes, traitements génotoxiques). La principale source de ROS connue aujourd'hui est la mitochondrie par la respiration aérobie. On estime que 2 à 5% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial est transformé en radicaux superoxydes O_2^- de manière passive, continue et physiologique en conséquence d'un relargage d'électron. La formation des ROS mitochondriales nécessite l'expression d'une kinase redox-sensible, l'isoforme p66 de ShcA (p66^{shc}) qui stimule directement la production de ROS mitochondriales par l'oxydation du cytochrome C. En effet, les souris déficientes pour p66^{ShcA} ont une production de ROS diminuée, une résistance au stress augmentée et une espérance de vie prolongée (Migliaccio *et al.*, 1999; Giorgio *et al.*, 2005). En parallèle, les cellules peuvent également produire des ROS de manière active par les membres de la famille « NADPH oxydase » (NOX 1-5, Duox1 et 2). Les

NOXs catalysent la réduction de l'O₂ en utilisant comme donneur d'électron le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH dans sa forme réduite ou NADP dans sa forme oxydée). La myéloperoxydase (MPO) peut produire une espèce extrêmement pro-oxydante : l'acide hypochloreux (HOCl) à partir de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) au sein des phagosomes et notamment par les cellules granuleuses et les macrophages pour se défendre contre les bactéries. Cet exemple montre que les espèces réactives de l'oxygène peuvent être essentielles à la survie de l'organisme L'histoire complète de la découverte et des mécanismes de la MPO ont été revus en 2005 (Klebanoff, 2005).

2. Régulation des ROS

a) Régulation enzymatique

Pour limiter l'accumulation du stress oxydatif, les organismes aérobies ont mis en place des systèmes de défense pour échapper aux effets délétères des ROS. Les radicaux superoxydes produits par la respiration mitochondriale ou les NOX sont convertis très rapidement en H₂O₂ par des mécanismes de régulation très fins impliquant des protéines spécialisées telles que la superoxide dismutase mitochondriale (Mn-SOD, SOD2), cytosolique (Cu/Zn-SOD1) ou membranaire et extra-cellulaire (Cu/Zn-SOD3) (Pervaiz, Taneja and Ghaffari, 2009) tels que illustré en figure 20.

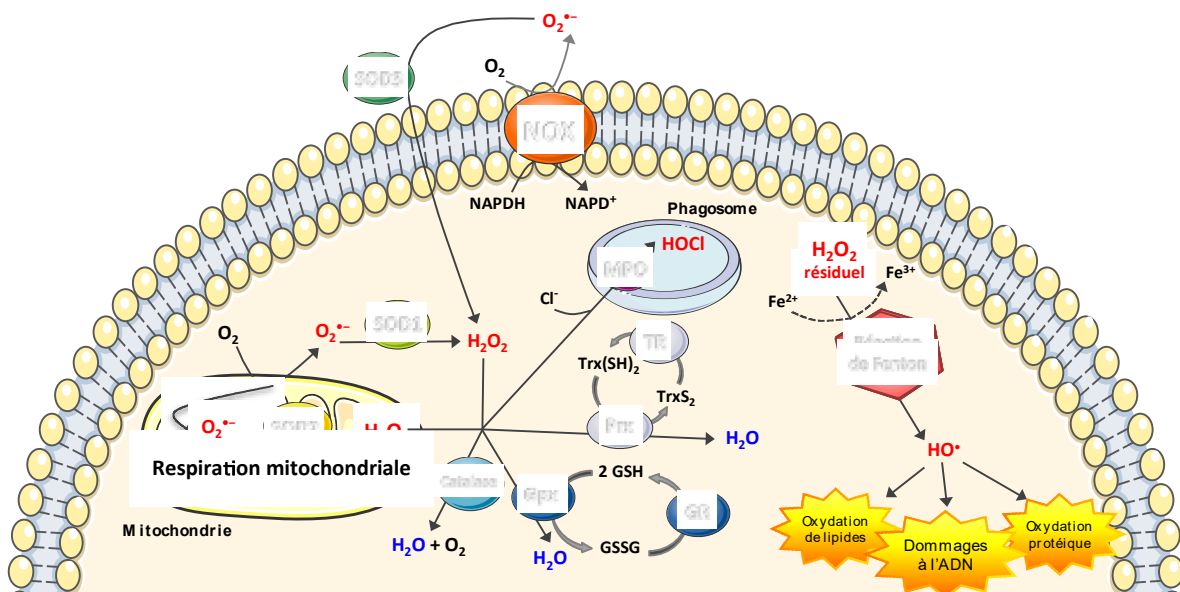


Figure 20 : représentation schématique de la génération de H₂O₂ et leur recyclage.

La respiration mitochondriale produit des radicaux superoxydes qui sont converties en peroxyde d'hydrogène par les enzymes antioxydantes (SOD, catalase, peroxiredoxine, glutathion-peroxydase). L'accumulation d'H₂O₂ en présence d'ions ferreux engendre la réaction de Fenton et la production de radicaux hydroxyles à l'origine du stress oxydatif. 52

L'accumulation d' H_2O_2 , en présence d'ions ferreux réduits, conduit à l'activation d'une réaction de Fenton qui génère des radicaux hydroxyles très réactifs. Il est donc nécessaire que l'action des SOD soit complétée par d'autres enzymes capables de transformer l' H_2O_2 : la catalase, la peroxiredoxine (Prx), les glutathion-peroxydases (Gpx)(COHEN and HOCHSTEIN, 1963; Michiels *et al.*, 1994; Hofmann, Hecht and Flohé, 2002). Le glutathion réduit (GSH) est considéré comme l'un des antioxydants endogènes majeurs de la cellule.

L'analyse de souris déficientes pour *Atm* (*Atm*^{-/-}), responsable de l'ataxie télangiectasie chez l'Homme, a montré de hauts niveaux de ROS dans de nombreux organes ainsi que dans les CSH. Les niveaux élevés de ROS des souris *Atm*^{-/-} sont dus à la dérégulation des systèmes anti-oxydatifs majeurs tels que la catalase, Gpx et SOD (Barzilai, Rotman and Shiloh, 2002)(Ito *et al.*, 2004). Les CSH des souris *Atm*^{-/-} ont des capacités de reconstitution très réduites comparées aux progéniteurs, ainsi qu'une activation de p38MAPK. Un niveau de ROS élevé ou une activation de p38MAPK induisent une déplétion des CSH normales au cours de transplantations sériées qui peut être limitée par un traitement antioxydant au N-Acetyl Cysteine. En 2007, l'utilisation du DCF-DA (2,7-dichlorofluoresceine diacétate), un marqueur fluorescent des ROS, a montré que les progéniteurs hématopoïétiques (Lin-CD45+AnnexineV-) peuvent être classés en deux groupes selon leur niveau de ROS qui corrèlent directement avec leurs propriétés de reconstitution et donc leurs propriétés souches. La fraction avec un faible niveau de ROS DCF-DA^{low} contient une population de cellules au potentiel de reconstitution plus important que les DCF-DA^{high}, qui elles présentent un biais de différenciation myéloïde (Jang and Sharkis, 2007). Le biais de différenciation déplacé vers le lignage myéloïde est l'une des caractéristiques des CSH âgées. Ainsi, exposer les CSH aux ROS induit une perte de leurs propriétés souches et leur mort. Par ailleurs, il a été démontré que l'enzyme anti-oxydative Gpx-3 est déterminante dans l'auto-renouvellement des CSH mais qu'elle est également surexprimée par les cellules souches leucémiques (Herault *et al.*, 2012).

Plusieurs travaux ont montré que les organismes aérobies se servent des ROS comme signal de transduction pour réguler leur survie et leur prolifération. Ainsi, l'équipe de Yamamoto a montré en 2009 que le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), un agent différenciant qui, induit la production de ROS qui sont

responsables de la différenciation des lignées leucémiques U937 et HL60 puisque leur inhibition par un antioxydant empêche la différenciation. L'utilisation d'un antioxydant sur la lignée 32Dcl3, traitée par l'IL-3 et l'EPO, inhibe la phosphorylation de STAT5, d'AKT, de MEK et d'ERK, démontrant que les ROS sont nécessaires à l'activation de ces voies (Iiyama *et al.*, 2006).

b) Régulation transcriptionnelle

La famille des facteurs de transcription FoxO (Forkhead homeobox type O) est connue pour réguler de nombreux processus cellulaires comme l'arrêt du cycle ainsi que dans le statut redox des CSH (Storz, 2011). La délétion de FoxO3 ou la triple délétion des facteurs FoxO1/3/4 chez les souris diminuent les niveaux d'enzymes antioxydantes (catalase ou SOD2) qui induit une élévation des ROS (Miyamoto *et al.*, 2007, 2008; Tothova *et al.*, 2007). L'excès de H₂O₂ induit une phosphorylation de p38MAPK chez ces souris, associée à une diminution des capacités d'autorenouvellement des CSH, une diminution de leur nombre et une accélération du cycle cellulaire. Ceci implique donc que les ROS sont également des régulateurs de quiescence. Comme PI3K inhibe l'activité des membres de la famille FoxO (Tran, 2002) et que Pten est un régulateur négatif de PI3K, alors Pten pourrait réguler la fonction des cellules souches par l'activation indirecte des facteurs de transcription FoxO. De plus, les capacités de reconstitution des CSH Pten^{-/-} n'est pas restauré par l'utilisation d'antioxydants (Lee *et al.*, 2010).

NRF2 (Nuclear factor erythroid 2 related factor 2) est un facteur de transcription de type leucine-zipper et d'expression ubiquitaire capable de réguler la transcription de ses gènes cibles par liaison aux séquences spécifiques *Antioxidative Responsive Elements* (ARE)(Nioi *et al.*, 2003). NRF2 peut dimériser avec les petites protéines MAF pour activer la transcription de leurs gènes cibles dont notamment les enzymes redox pour réduire le niveau de ROS. Plusieurs études ont utilisé des modèles murins *Nrf2*^{-/-} pour montrer son rôle dans la carcinogénèse. Par exemple, des souris *Nrf2*^{-/-} ont une incidence de tumeurs cutanées et un nombre de tumeurs par souris plus important après exposition à des cancérigènes (Hu *et al.*, 2006). Par ailleurs, il a été montré que les cellules fibroblastiques issues d'embryons murins *Nrf2*^{-/-} étaient plus sensibles à la doxorubicine que les cellules *Nrf2*^{+/+}. La buthionine sulfoximine (BSO), molécule abaissant le niveau de glutathion intra-cellulaire, provoque une sensibilité accrue à

la doxorubicine dans ces cellules *Nrf2*^{-/-} par rapport aux cellules sauvages, montrant que NRF2 peut participer à un phénotype de résistance aux chimiothérapies (Lee *et al.*, 2008).

Stat3 est un facteur de transcription décrit dans la régulation des CSH et des CSPH, permettant leur prolifération et leur survie. En 2012, Mantel a mis en évidence le rôle de Stat3 dans la fonction mitochondriale à l'aide de souris déficientes en Stat3. Les souris *Stat3*^{-/-} présentent une élévation des ROS associée à une dérégulation de l'activité mitochondriale associée à une diminution importante des CSH et une augmentation du nombre de progéniteurs (Mantel *et al.*, 2012).

Il apparaît qu'une balance des niveaux de ROS est essentielle pour le maintien du compartiment des CSH. Toute modification dans l'équilibre redox du glutathion est indicatrice de stress oxydatif et est observée dans le vieillissement et de nombreuses pathologies telles que le SIDA, les cancers et les maladies neurodégénératives. En 2010, le regain d'intérêt pour le métabolisme oxydatif des cellules leucémiques n'a fait que croître avec la découverte des mutations des isocitrate déshydrogénases IDH-1 et IDH-2 dans 8 et 15 % des LAM respectivement (Gross *et al.*, 2010). Des mutations de type gain de fonction de ces deux enzymes provoquent une élévation des ROS dans les cellules leucémiques.

3. ROS et microenvironnement

Pour contrôler le niveau des ROS dans les CSH, les cellules ont non seulement recours à des mécanismes de régulation intrinsèques mais également à l'environnement extrinsèque. En effet, les niches, beaucoup plus hypoxiques que l'air ambiant, interviennent dans la régulation des ROS. Les différents compartiments de la niche ne sont pas égaux en terme de niveau d'oxygénation en raison des zones enrichies en capillaires sanguins. Les zones les plus distantes des vaisseaux forment un environnement plus hypoxique et sont enrichies en CSH (Parmar *et al.*, 2007) qui, en limitant leur exposition à l'oxygène, peuvent contrôler plus facilement leur niveau de ROS. Des travaux utilisant l'imagerie en temps-réel ont montré que les CSH se déplacent préférentiellement à distance des vaisseaux de la moelle osseuse après greffe (Lo Celso *et al.*, 2009). L'une des caractéristiques des CSH est leur capacité d'efflux des drogues, tel que le marqueur nucléaire

Hoechst 33342. En 2004, une étude a montré que l'hypoxie favorise le maintien des capacités d'efflux des CSH (Krishnamurthy *et al.*, 2004). HIF-1 α est un facteur de transcription connu pour son rôle majeur dans les réponses à l'hypoxie. Il a été décrit que HIF-1 α est fortement exprimé dans les LT-CSH et que les modèles murins délétés conditionnellement pour HIF-1 α ont une capacité de reconstitution amoindrie (Simsek *et al.*, 2010). Il a alors été suggéré que HIF-1 α participe à la régulation redox pour maintenir les CSH. De même, HIF2 pourrait jouer un rôle important dans la production des ROS. En effet, l'inactivation de HIF-2 α dans les CD34 + humaines réduit leur capacité de repopulation à long terme. Les HSPC déficientes en HIF-2 α ont une production accrue de ROS qui ensuite participent à la génération d'un stress du réticulum endoplasmique (ER) et déclenche l'apoptose. Il a été établi que les CSH utilisent préférentiellement la glycolyse plutôt que la respiration mitochondriale pour produire leur énergie (Xu *et al.*, 2013) et que les LT-CSH murines présentent moins de mitochondries ainsi qu'une proportion non-négligeable de mitochondries inactives par rapport au progéniteurs hématopoïétiques (Mantel, Messina-Graham and Broxmeyer, 2010). Le microenvironnement semble donc jouer un rôle majeur dans la protection des CSH en permettant de les isoler des sources de ROS. Ainsi, il a été proposé l'hypothèse que pour protéger les CSH des ROS, il serait intéressant de les manipuler dans un environnement hypoxique. En 2016, les travaux de Mantel ont montré que l'air ambiant induit un « choc à l'oxygène » et un stress des CSH médiés par la production de ROS (Mantel *et al.*, 2015). Les conclusions de cette étude constatent que le nombre réel de CSH obtenu dans le sang de cordon est sous-estimé à cause de la perte rapide d'une partie des CSH dépendante de la génération des ROS. Ce travail permet d'envisager une amélioration des protocoles de collectes de CSH dans le contexte des greffes, aujourd'hui limitées.

4. Les ROS et CXCR4/CXCL12

La voie de signalisation CXCR4/CXCL12 a des rôles majeurs dans la biologie des CSPH dont la migration, la rétention dans les niches, la prolifération et la quiescence des CSH. Il a été démontré que l'inactivation de CXCR4 compromet la migration des CSH et des CSPH en situation de stress (Peled *et al.*, 1999; Foudi *et al.*, 2006; Nagasawa, 2014).

La publication de Mantel en 2010 qui décrit les différences du nombre de mitochondries entre les CSH et les progéniteurs fait également état du rôle du CXCL12. A l'aide d'un modèle murin surexprimant CXCL12, il a montré que l'exposition au CXCL12 augmente la masse mitochondriale mais que pourtant cela ne se traduit pas par une activité augmentée des mitochondries. Il a par ailleurs été montré que l'activation du récepteur du CXCL12, CXCR4, entraîne l'inhibition de PGK-1, enzyme majeure de la glycolyse et que CXCR4 lui-même est capable d'inhiber la glycolyse (Wang *et al.*, 2007). Il est donc probable que l'axe CXCR4/CXCL12 joue un rôle dans la régulation de l'activité mitochondriale et métabolique des CSH avec un impact important sur le niveau des ROS.

Chapitre 6 : Modulation des programmes d'expression génique par les facteurs de transcription de l'hématopoïèse et de la leucémogénèse

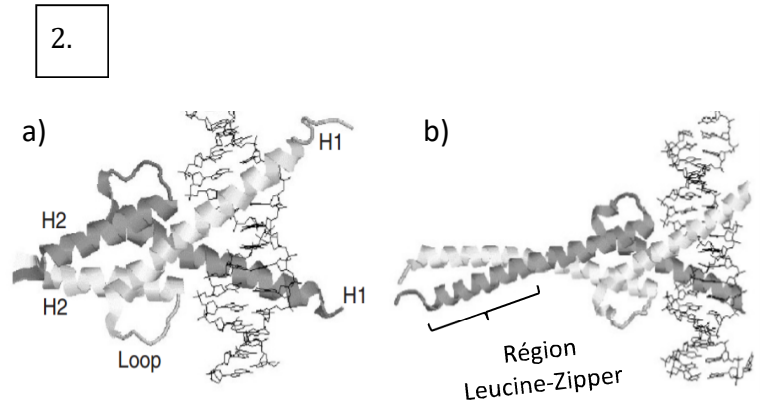
Une partie des facteurs de transcription (FT) incontournables pour le maintien des CSH a été identifiée en étudiant l'ontogenèse du système hématopoïétique.

Différentes familles de FT caractérisées par la nature de leur domaine de liaison à l'ADN sont connues pour leur rôle majeur dans l'hématopoïèse. Dans ce chapitre nous n'aborderons que ceux impliqués dans les processus de différenciation ainsi que ceux impliqués dans les processus de développement des leucémies aiguës

1. Facteurs de transcription à bHLH

Les facteurs de transcription (FT) possédant un motif hélice-boucle-hélice basique (bHLH) font partie d'une classe de FT comportant deux hélices alpha jointes par une boucle. En général, les protéines qui contiennent ce domaine se lient sous forme de dimères (homo ou hétéro-dimères) par l'interaction des résidus hydrophobes des hélices alpha (figure 21-2). Enfin ils possèdent une séquence consensus CANNTG (où N est n'importe quel nucléotide) appelé E-box, permettant la liaison à l'ADN. Les deux nucléotides au centre de l'hexamère (NN) sont spécifiques des différentes classes de bHLH. Ce motif a d'abord été identifié chez les E-protéines E12 et E47 et plus de 200 FT à bHLH ont été identifiés à ce jour. La première classification de ces protéines à bHLH était basée sur la spécificité de liaison à l'ADN, le potentiel de dimérisation et la distribution tissulaire (figure 21-1)(Murre *et al.*, 1994). Le nombre de FT bHLH découverts augmentant, une seconde classification en six groupes, basée sur une approche phylogénétique, a été proposée prenant également en compte la séquence E-Box reconnue et la présence ou non de domaines additionnels. En effet en plus du domaine bHLH, certaines familles comportent en carboxy-terminal un domaine PAS (Per-Arnt-Sim), Orange (répresseur transcriptionnel), COE ou leucine-zipper (LZ), alors que les protéines Id n'ont pas de domaine basique (figure 21-3) (Ledent, Paquet and Vervoort, 2002; Jones, 2004).

1.	
CLASS I E12 E47 E2-2 HEB daughterless	CLASS II MyoD Myogenin Myf-5 AS-C
CLASS III TFE3 TF-EB MYC	CLASS IV MAX MAD
CLASS V Id emc	CLASS VI Hairy Enhancer of split



3.

Groupe phylogénétique	E-Box et domaines additionnels	Classification selon Murre et al.	Exemple de membres de ce groupe : Famille (gènes)
A	CAGCTG ou CACCTG	I, II	MyoD (Myf) , SCL (Tal1,Tal2, Lyl), Achaete-Scute (ASCL1,2,3), E12/ E47 (E2A, TF12, TCF4), NeuroD (Hath, NDF), Hand,Twist, Net, Atonal, Neurogenin, Mist, MyoR, PTF, NSCL
B	CACGTG ou CATGTTG Contient un domaine LZ	III, IV	Mad, Max, Myc, SREBP, TF4, USF, MITF, SRC, Figa, Mnt
C	ACGTG ou GCGTG Contient un domaine PAS		ARNT, HIF, Clock, Siml, Bmal
D	Pas de domaine basique Antagonistes du groupe A	V	Emc (Id1, 2, 3, 4)
E	CACGCG ou CACGAG Contient un domaine Orange	VI	Hairy, Hey, E(spl)
F	Contient un domaine COE		Coe (EBF1, EBF3, Coe2, Coe4)

Figure 21 : Classification des facteurs de transcription à bHLH

1. Classification originale selon Murre et al en 1994.
2. Représentations imagées des structures des bHLH a) homodimère MyoD et b) hétérodimère Mad-Max (les 2 structures ne sont pas à l'échelle).
3. Synthèse de la classification phylogénétique (Ledent et al, 2002 ; Jones, 2004).

Certains FT à bHLH sont exprimés de façon ubiquitaire et régulent généralement le cycle cellulaire alors que d'autres FT à bHLH sont exprimés de façon tissu-spécifique et participent au développement et à la différenciation tissulaire.

Ces FT jouent des rôles majeurs dans le développement, le système immunitaire, les rythmes circadiens, les réponses à l'hypoxie, l'homéostasie des tissus et d'autres processus, en régulant très finement les programmes

d'expression génique. Les fonctions cellulaires exercées dépendent de la nature des interactions établies avec les autres FT.

a) SCL (Tal1 et Lyl1)

SCL (stem cell leukemia protein) est une famille de FT à bHLH comprenant TAL1 (T-cell lymphocytic leukemia protein 1), Tal2, Lyl1 et 2, considérés comme régulateurs clé de l'hématopoïèse normale et pathologique. Tal1 a été identifié par son implication dans les réarrangements chromosomiques et sa surexpression aberrante retrouvées dans les LAL-T.

Tal1 est essentiel au cours du développement et de l'hématopoïèse embryonnaire dans la différenciation du mésoderme car il participe à la formation des angioblastes (précurseurs endothéliaux). La délétion de TAL1 induit une létalité embryonnaire à E8.5 due à l'absence complète d'hématopoïèse primitive et de vasculature. Tal1 est exprimé de façon concomitante avec LMO2 (Lim only protein 2) (Hoang, Lambert and Martin, 2016). De nombreuses études ont montré que dans les cellules hématopoïétiques TAL-1 agit au sein de complexes multi-protéiques incluant entre autres les facteurs E47, LMO2, Ldb1 et un facteur GATA (GATA-1 ou GATA-2) pour contrôler la transcription de Kit, Runx-1 ou la glycophorine A par exemple (Reynaud *et al.*, 2005).

Lyl1 est un bHLH de la même sous-famille que Tal1 et possède un domaine bHLH pratiquement identique à celui de Tal1. En effet, alors que l'inhibition induite de Tal1 ou de Lyl1 affecte plutôt subtilement l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques, la double délétion de Tal1 et de Lyl1 chez des souris abolit presque totalement la capacité de repopulation des CSH et ces cellules meurent par apoptose, suggérant un rôle compensatoire entre les deux protéines (Correia *et al.*, 2016).

b) c-myc

c-myc est un facteur nucléaire impliqué dans de nombreux processus biologiques dont le contrôle de la division cellulaire, l'apoptose et la différenciation. Les souris invalidées pour c-myc présentent une accumulation de CSH dans la moelle osseuse. La surexpression de c-myc provoque un autorenouvellement diminué des CSH au profit d'un engagement massif dans la différenciation, suggérant un rôle important de c-myc dans le choix du destin des

CSH (autorenouvellement ou différenciation). Les travaux de Trumpp suggèrent que le maintien d'une expression faible de c-myc est le garant d'un maintien à l'état souche des CSH (Scognamiglio *et al.*, 2016)(Essers and Trumpp, 2010).

2. Autres facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse

a) *RUNX1*

Runx1 (AML1) fait partie de la famille des Core Binding Factor (CBF) et est essentiel au développement des CSH. Runx1 est également connu comme CBF α 2 et peut se fixer à l'ADN quand il forme un hétérodimère avec CBF β . Les souris portant des mutations homozygotes pour Runx1 montrent une érythropoïèse normale mais meurent à E12,5 par défaut d'hématopoïèse au niveau du foie fœtal. De plus les CSH embryonnaires murines Runx1 $^{-/-}$ sont incapables de reconstituer l'hématopoïèse de souris irradiées (Okuda *et al.*, 1996).

Runx1 est la cible de translocation chromosomique la plus fréquente dans les leucémies et notamment la translocation t(8;21) retrouvées dans les LAM de type M2. Ce réarrangement conduit à la création de la protéine de fusion Runx1/Runx1T1 (AML1/ETO) en conservant le domaine RUNT de Runx1 pour la liaison à l'ADN et le recrutement de répresseurs transcriptionnels par Runx1T1. Des techniques de co-immunoprécipitation et de double hybride ont mis en évidence que Runx1T1 et la protéine de fusion Runx1/Runx1T1 recrutent les facteurs corépresseurs N-CoR et mSin3, qui interagissent avec des histone-déacétylases pour inhiber la transcription (Lutterbach *et al.*, 1998, Shima and Kitabayashi, 2011).

Runx1 a été retrouvé dans d'autres translocations chromosomiques, par exemple avec TEL, EVI1, MTG16, EBP ou LRP16.

b) *GATA1/GATA2*

Ces protéines doivent leur nom au fait qu'ils se lient à un site consensus (A/T)GATA(A/G) au niveau du promoteur de leurs gènes cibles pour en moduler l'expression. Six facteurs GATA, GATA1 à GATA6, contiennent un domaine de liaison à l'ADN formé de deux doigts de zinc. Le groupe hématopoïétique, qui contient les facteurs GATA1, GATA2 et GATA3. Des études de souris knock-out

pour ces membres ont révélé leur importance dans le développement hématopoïétique. GATA1 contrôle l'expression des gènes de la lignée érythroïde et est essentiel à la maturation des érythroblastes (Colin *et al.*, 1990). A l'inverse GATA2 est un marqueur embryonnaire de l'hématopoïèse précoce et est nécessaire au maintien des CSH. La diminution de l'expression de GATA2 est nécessaire à la différenciation des CSH (DeVilbiss *et al.*, 2016).

c) HOXB4

Les facteurs de transcription de la famille HOX (Homeobox) sont des régulateurs importants de la prolifération et de la différenciation des CSH. HOXB4 notamment est un régulateur positif de l'autorenouvellement des CSH. Ainsi, sa surexpression dans des CSH de souris induit leur amplification et le maintien de leur capacité de reconstituer le système hématopoïétique de souris létalement irradiées sans transformation leucémique (Antonchuk, Sauvageau and Humphries, 2001). L'amplification *in vitro* des CSH humaines est également possible sur un stroma sécrétant HOXB4 (Calvo *et al.*, 2012). Il est suggéré que HOXB4 régule les réponses des CSH aux signaux extrinsèques par régulation directe de voies de signalisation comme Wnt et Notch et inhibition de la voie de signalisation du TNF- α (Schiedlmeier *et al.*, 2007). Il a été montré que les cellules *Fancc*^{-/-} (anémie de Fanconi) sont hypersensibles au TNF- α et la surexpression de HOXB4 dans ces cellules restaure la réponse des cellules au TNF- α (Milsom *et al.*, 2009).

d) PU.1

PU.1 est un facteur de transcription de la famille *ets*. La délétion de PU.1 chez des souris entraîne une létalité des embryons en fin de gestation et des défauts de différenciation érythroïde, myéloïde et lymphocytaire B. La surexpression de PU.1 suffit à l'immortalisation des érythroblastes (Scott *et al.*, 1994). Dans un premier temps, PU.1 se lie au niveau du doigt de zinc C-terminal de GATA1 afin de maintenir la pluripotence de ces cellules en s'inhibant mutuellement. Un gain de fonction de la protéine PU.1 entraîne le développement vers la lignée myéloïde tandis qu'un gain de fonction de la protéine GATA1 induit un engagement vers les lignées érythrocytaires/mégacaryocytaires. Un travail récent a montré que PU.1 est essentiel pour le développement des leucémies MLL et que son expression permet la progression du cycle cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. PU.1 se lie directement aux loci génomiques de ses gènes cibles *in vivo* et est nécessaire pour

maintenir leur expression dans les CSH et les progénitrices hématopoïétiques normaux et leucémiques. Ces résultats indiquent que PU.1 contribue au développement des leucémies MLL (Zhou *et al.*, 2014).

e) EKLf

EKLf (Erythroid Krüppel-like Factor, KLF1) est un FT spécifique de la lignée érythroïde qui appartient à la famille CACC-box car il se lie à l'ADN via un site CCNCNCCCN et a particulièrement été décrit dans la régulation de la transcription du gène de la β -globine, composant de l'hémoglobine. Le promoteur de la β -globine est retrouvé muté dans les cas de β^+ -thalassémie mineure ou intermédiaire (selon la diminution de quantité de β -globine). L'inactivation de EKLf induit une anémie qui provoque la mort embryonnaire à E15. En revanche une surexpression d'EKLf est à l'origine d'un nombre réduit de plaquettes. EKLf est directement et positivement régulé par GATA1 et les gènes régulés par EKLf et GATA1 montrent une très grande similitude (DeVilbiss *et al.*, 2016).

f) C/EBP α

Le C/EBP α (CCATT/enhancer binding protein alpha) joue un rôle majeur dans la prolifération en régulant l'expression de récepteurs impliqués dans la différenciation myéloïde comme les récepteurs du GCSF et du MCSF. Les souris déficientes en C/EBP α ne possèdent pas de granulocytes matures mais le blocage de la différenciation des progéniteurs n'évolue pas vers la leucémie (Radomska *et al.*, 1998)(Ohlsson *et al.*, 2015). Au contraire, l'expression induite de C/EBP α par des précurseurs myéloïdes bi-potents promeut la différenciation des neutrophiles au dépend des monocytes. C/EBP α interagit avec PU.1 pour la spécification myéloïde et les deux facteurs de transcription se régulent l'un l'autre (Shima and Kitabayashi, 2011).

g) RAR α

RAR α est un facteur de transcription ligand-dépendant stimulé par l'acide rétinoïque. Il forme un hétérodimère avec le récepteur X rétinoïque (RXR) pour lier l'ADN et réguler ses gènes cibles. RAR α interagit avec des corépresseurs de transcription mais en présence d'acide rétinoïque, les corépresseurs sont libérés et des coactivateurs transcriptionnels sont recrutés pour activer la transcription dépendante de RAR α qui interviennent dans la différenciation myéloïde. La LAM promyélocytaire

M3 est caractérisée par des translocations du gène RAR α dont la plus fréquente est PML-RAR α (Du *et al.*, 1999). La fusion PML-RAR α empêche la libération des corépresseurs en présence d'acide rétinoïque et bloque la différenciation. L'utilisation thérapeutique de l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA) dans la LAM promyélocytaire permet la libération des facteurs corépresseurs et induire la différenciation des blastes leucémiques.

h) BMI1

Les protéines polycomb forment des complexes multiprotéiques qui jouent un rôle important dans le maintien de la répression de la transcription de gènes cibles, comme p16 et p19 (acteurs du contrôle du cycle cellulaire). Bmi-1 a notamment été identifié comme étant un gène essentiel pour l'autorenouvellement des CSH *in vivo*. Les souris knock-out pour Bmi-1 présentent un appauvrissement continu en CSH ; celles-ci présentent également une perte de fonctionnalité lorsqu'elles sont greffées à des souris létalement irradiées (Park *et al.*, 2003).

La figure 22 (page suivante) résume schématiquement l'implication de facteurs de transcription en fonction du stade de différenciation hématopoïétique (Orkin and Zon, 2008).

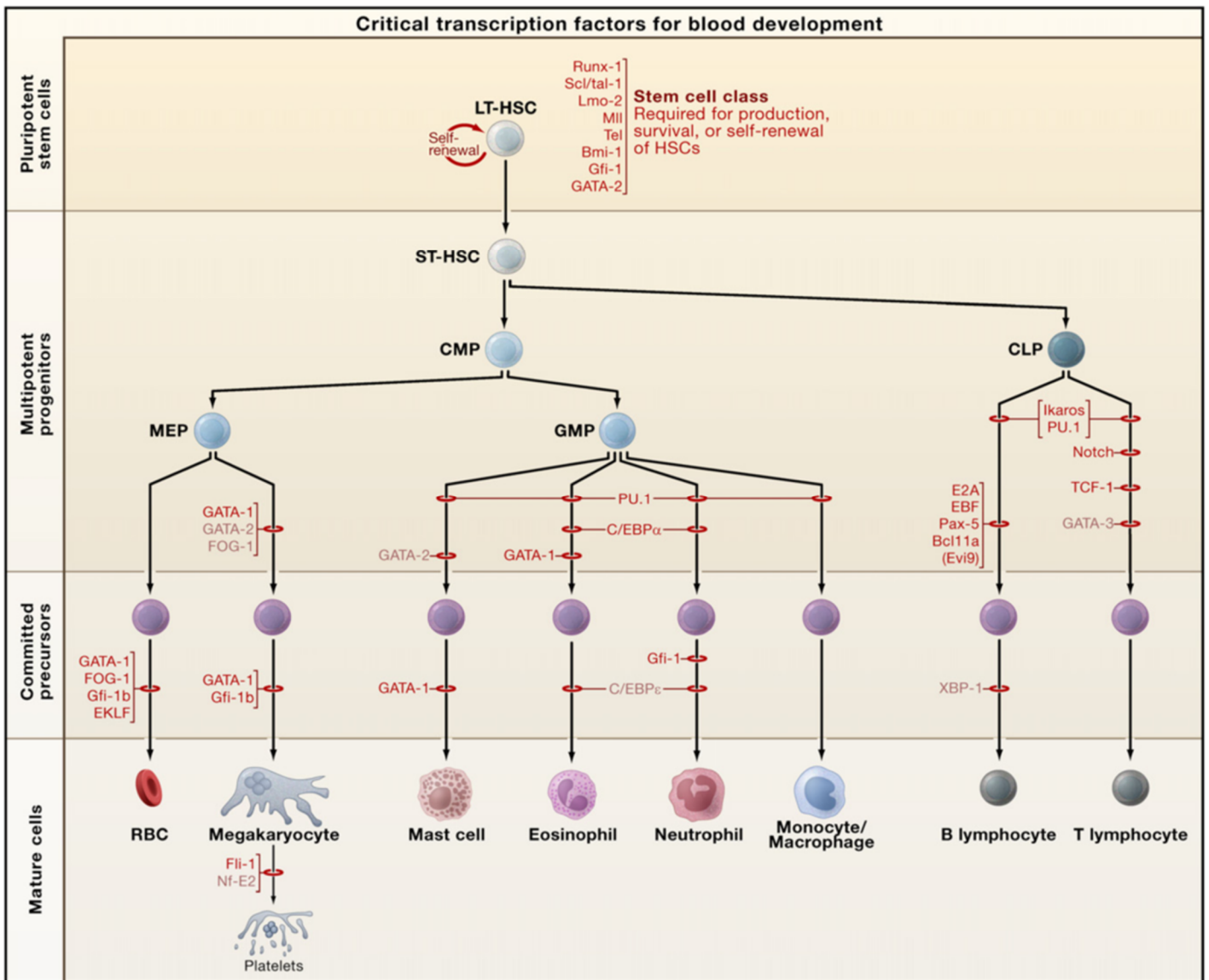


Figure 22 : les facteurs de transcription clés du développement hématopoïétique (Orkin, 2008).

L'absence du facteur de transcription à un stade donné (gène KO) bloque le stade de développement associé.

3. ASCL2, Achaete-Scute like 2

a) ASCL2 chez la souris

ASCL2 (Achaete Scute-like 2) est un facteur de transcription à domaine hélice-boucle-hélice (bHLH). Il est également connu sous le nom de MASH2 (Mammalian Achaete-Scute Homolog 2) chez la souris ou bHLHa45 dans la classification des bHLH. Il se situe dans la région distale du chromosome 7. La régulation d'expression d'*Ascl2* chez la souris semble complexe et dépendante de l'empreinte maternelle tout comme les gènes présents dans son cluster génique *Ins*, *Igf2* et *H19*

(Tanaka *et al.*, 1999). L'ARNm de 1612pb porté par trois exons, dont deux sont codants, est traduit en une protéine de 263aa.

b) ASCL2 chez l'Homme

ASCL2 est anciennement connu sous le nom HASH2 (Human Achaete-Scute Homolog 2) chez l'Homme. Chez l'Homme le gène *ascl2* se situe sur chromosome 11 sur le bras court au niveau de la bande 11p15.5 dans un cluster très conservé contenant les gènes *Ins*, *Igf2* et *H19*. L'ARNm de 1864pb porté par 2 exons, dont seulement le 1^{er} exon est codant, est traduit en une protéine de 193aa. Cela signifie que seulement 37% des séquences d'ARNm humaines et murines se recourent. Cependant une portion de 618pb est plus conservée et a une identité de 78% entre les 2 séquences (figure 23). Au niveau protéique, la séquence totale d'ASCL2 humain partage 71% d'homologie avec la séquence murine mais 98% d'homologie au niveau du bHLH qui est hautement conservé. Contrairement à la souris, chez l'Homme, ASCL2 échappe à l'empreinte parentale et possède une expression biallélique (Miyamoto *et al.*, 2002). Le gène *Ascl2* humain contient deux promoteurs, codant pour deux protéines : ASCL2 et HASAP (Human Achaete Scute Associated Protein), protéine à laquelle il manque le domaine bHLH (Westerman *et al.*, 2001). L'expression et les fonctions de cette protéine HASAP ne sont pas décrites dans la littérature. Dans ce projet, nous avons uniquement porté notre attention sur ASCL2.

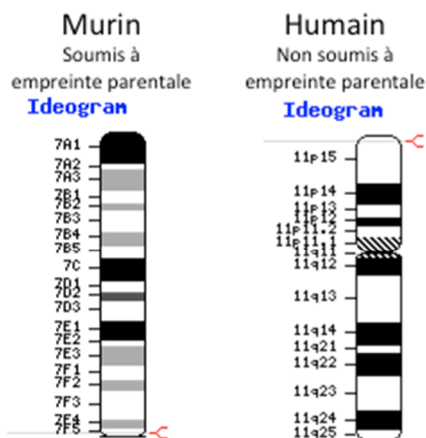


Figure 23 : différences connues entre les gènes et les ARN d'ASCL2 murin et humain

Seulement 37% d'homologie ARNm
78 % d'homologie protéique
98% d'homologie du domaine bHLH



c) Les fonctions d'ASCL2

L'essentiel de nos connaissances sur les fonctions d'ASCL2 nous vient de l'étude du système gastro-intestinal où ASCL2 joue un rôle majeur dans le maintien des cellules souches intestinales. En effet, sa surexpression entraîne une hyperplasie intestinale signifiant qu'il est impliqué dans la prolifération (van der Flier *et al.*, 2009). A l'inverse, l'inhibition de l'expression d'ASCL2 entraîne une perte des cellules souches intestinales. Ces résultats suggèrent qu'il participe au maintien de l'identité souche au sein des cryptes intestinales (Yan and Kuo, 2015). Son mode d'action dans ce système pourrait passer par la voie Wnt/B-caténine. En effet, ASCL2, TCF4 et B-caténine peuvent former un complexe tripartite pour réguler l'expression d'un panel de 196 gènes à forte signature souche (Schuijers *et al.*, 2015). En accord avec le rôle important d'ASCL2 dans le système gastro-intestinal, la diminution d'expression des gènes associés à l'inactivation du *tcf4* dans des organoïdes intestinaux est en partie compensée par la surexpression d'ASCL2 qui permet également *in vitro* la survie prolongée des cellules *tcf4*^{-/-}. ASCL2 est régulé dans une boucle directe d'autoactivation qui entretient le statut souche des cellules de cryptes intestinales à la condition d'un niveau d'expression minimal de Wnt. En effet, la surexpression d'ASCL2 dans les organoïdes entraîne une augmentation du nombre de cellules Lgr5⁺ et Olfm4⁺, marqueurs de cellules souches intestinales, ainsi qu'une augmentation des cellules en cycle Ki67⁺ (van der Flier *et al.*, 2009). En accord avec une interaction étroite entre ASCL2 et la voie Wnt, il a été démontré qu'un long ARN nucléaire non-codant, cible directe de TCF4/B-caténine nommé WnTRLINC1 régule positivement ASCL2 (Giakountis *et al.*, 2016).

En dehors du système gastro intestinal normal, ASCL2 est surexprimé dans le cancer colorectal, cellules dans lesquelles son expression est régulée par le microenvironnement, CXCR4 et la voie Wnt (Jubb *et al.*, 2006)(Herbst *et al.*, 2014). L'implication de la voie Wnt dans la régulation de l'expression d'ASCL2 est montrée par son augmentation en réponse à un agoniste de Wnt (TWS119) Réciproquement, ASCL2 régule l'expression de CXCR4 favorisant le processus tumoral, métastatique et la chimiorésistance (Kwon *et al.*, 2013). Enfin, dans ces cellules, l'inactivation de CXCR4 entraîne une diminution d'ASCL2. Des travaux récents montrent également qu'il augmente l'agressivité des cellules de cancer du

côlon. ASCL2 et CXCR4 sont plus exprimés dans les clones métastatiques du cancer du côlon que dans les tumeurs primaires et l'inhibition de CXCR4 est associée à une diminution de l'expression d'ASCL2 (Dessein *et al.*, 2010). L'ensemble de ces résultats confortent les travaux montrant que ASCL2, en tant que cible de Wnt, est un régulateur maître de l'identité et du programme transcriptionnel des cellules souches intestinales normales et tumorales.

En plus du système gastro intestinal, ASCL2 pourrait également jouer un rôle dans la myogénèse. En effet, il vient d'être décrit comme inhibiteur des facteurs de transcription régulateurs de la myogénèse (MRFs). Au cours du développement ASCL2 est détecté transitoirement dans une population de myoblastes Pax7+MyoD+ qui deviennent des cellules satellites Pax7+MyoD- à la naissance. Par des techniques de chromatine-immunoprécipitations, ce travail a montré que la surexpression d'ASCL2 inhibe la prolifération et la différenciation des myoblastes en fixant les sites E-box communs aux MRFs dans les promoteurs des gènes musculaires sans pour autant activer leur transcription. Par ailleurs, ASCL2 peut inhiber la transcription par séquestration des E-protéines classiques MyoD et MyoG en formant des hétérodimères inactifs sans pour autant affecter leurs niveaux d'expression respectifs. Une surexpression de MyoD et MyoG pourra compenser la séquestration et lever l'inhibition induite par ASCL2 (Wang *et al.*, 2016). Enfin, de manière très surprenante, en comparant les séquences de la région basique de ASCL2, ils se sont aperçus qu'il y manque 3 acides aminés. Les auteurs proposent qu'ASCL2 pourrait fonctionner comme un inhibiteur partiel de transcription à cause de cette délétion partielle du domaine basique. Il est important de noter que les facteurs de transcription ID sont des répresseurs de la transcription en raison d'une absence totale du domaine basique.

Peu de publications décrivent les rôles d'ASCL2 dans d'autres systèmes, néanmoins il a été rapporté que ASCL2 est exprimé par les cellules de Schwann des nerfs périphériques adultes chez le rat. La surexpression d'ASCL2 induite par transfection dans des cellules de Schwann de rat a montré une régulation positive de l'expression de CXCR4 et p57kip2 (inhibiteur de cycline kinase-dépendante, CDKN1C) par transcriptome sur puce à ARN. De plus, ASCL2 régule négativement la prolifération quand il est surexprimé dans les cellules de Schwann en culture (Kury *et al.*, 2002).

Son rôle dans le système hématopoïétique est méconnu. Seul, un article publié en 2014 décrit le rôle essentiel d'ASCL2 dans le développement des lymphocytes T helper folliculaires.. De manière intéressante, en utilisant a technique de chIP-sequencing, ce travail a montré qu'ASCL2 lie l'ADN sur les E-box binding sites de motif 5'-CAG^G/cTG-3' et qu'il est capable de se fixer directement aux loci de CXCR4 et CXCR5 pour réguler positivement leur expression (Liu *et al.*, 2014). Ainsi, ASCL2 en régulant positivement l'expression des récepteurs à chimiokines CXCR4 et CXCR5 et en down-régulant celle du récepteur CCR7, contrôle la migration des lymphocytes T helper folliculaires et l'organisation des organes lymphoïdes secondaires (Liu *et al.*, 2014). Cette même équipe a montré qu'en utilisant une forme modifiée d'ASCL2 E127G, incapable de se fixer à l'ADN, il n'y a pas d'augmentation de l'expression de CXCR5, confirmant le rôle direct d'ASCL2 dans la régulation transcriptionnelle de ce gène. Ce même travail suggère également qu'ASCL2 pourrait jouer un rôle inhibiteur de différenciation des lymphocytes TH1, TH2 et TH17. En accord avec cette hypothèse, les données de chIP-sequencing et de transcriptome révèlent qu'ASCL2 se lie au promoteur du gène *Nfkb1*, codant pour IκBNS, régulant positivement l'expression de ce gène responsable de la différenciation des lymphocytes T helper folliculaires (Hosokawa *et al.*, 2016).

d) L'expression d'ASCL2 est associé à un mauvais pronostic

La surexpression d'ASCL2 est un marqueur associé au mauvais pronostic dans plusieurs types de cancers dont cancer du poumon à cellules squameuses détecté par immunohistochimie, le cancer du sein de sous-type luminal, les cancers gastriques ainsi que dans les ostéosarcomes où son expression augmentée est associée aux métastases (de Sousa E Melo *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2013; Conway *et al.*, 2014; Wentzensen *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015).

L'ensemble de ces données indique l'implication d'ASCL2 dans les pathologies néoplasiques. et une interaction réciproque forte entre ASCL2 et CXCR4.

Objectifs généraux du travail

L'axe CXCR4/CXCL12 a un rôle crucial dans l'hématopoïèse normale où il participe à la migration, la rétention et la survie des cellules. Malgré de nombreuses publications, les différents aspects de son rôle biologique dans la régulation des cellules hématopoïétiques normales restent à éclaircir. Les travaux du laboratoire ont montré que les CSH invalidées pour CXCR4 permettent la reconstitution hématopoïétique de souris irradiées. Cependant, nous avons observé que les CSH sont déplétées de manière progressive évoquant une déplétion engendrée par des lésions de l'ADN. Nous avons donc émis l'hypothèse d'un rôle possible de CXCR4 dans la régulation des ROS. Par ailleurs, nous avons abordé l'étude du facteur de transcription ASCL2 dans les LAM avec l'hypothèse sous jacente qu'il pouvait est la cible de la voie de signalisation de CXCR4 dans le contexte des pathologies myéloïdes. En effet, ASCL2, en tant que cible de Wnt, pouvait être régulé par l'axe CXCR4/CXCL12 lui même capable de réguler la voie Wnt canonique et non canonique. Dans ce contexte, et du fait que ASCL2 n'a jamais été décrit dans l'hématopoïèse, hormis les lymphocytes T folliculaires, nous avons dans un premier abordé l'étude de son expression dans les différents compartiments hématopoïétiques et dans les LAM. Nous avons ensuite abordé l'étude de sa fonction dans l'hématopoïèse normale et leucémique.

Article 1 : « L'axe CXCR4/CXCL12 s'oppose à l'épuisement des cellules souches hématopoïétiques par une protection sélective du stress oxydatif »

Le récepteur CXCR4 est un acteur majeur du contrôle des interactions des CSH avec leur niche. En effet, en interagissant avec la chimiokine CXCL12 (SDF-1) produite par différents types cellulaires de la niche, les CSH CXCR4+ sont maintenues dans leur environnement. En accord avec cette notion, les travaux précédents de l'équipe ont montré qu'en absence de CXCR4, les CSH et les progéniteurs sont présents en grand nombre dans le sang et la rate. En plus de ces anomalies de domiciliation médullaire, les CSH invalidées pour CXCR4 sont moins quiescentes et perdent progressivement leur capacité de reconstitution. Plusieurs questions restent encore à éclaircir quand à la fonction précise du récepteur CXCR4. En particulier, il reste à savoir si la fonction de CXCR4 est simplement de médier le maintien des CSH dans la niche permettant de percevoir les signaux issus du microenvironnement ou si la signalisation de CXCR4 a des effets propres sur la biologie des CSH.

Différents arguments de la littérature suggèrent que l'environnement dans lequel les CSH et les progéniteurs sont domiciliés joue un rôle protecteur pour les CSH. Cette protection s'exerce à différents niveaux dont la régulation de la quiescence et du métabolisme. Il faut noter que ces deux aspects culminent vers une régulation du niveau des ROS et la protection des CSH contre le vieillissement. Le récepteur CXCR4, une des cibles de l'hypoxie et des facteurs HIF, pourrait réguler ces deux processus cruciaux de manière indirecte par un simple effet de maintien des CSH dans des niches hypoxiques. Cependant, une action directe est également possible. En ce sens, la signalisation du récepteur CXCR4/CXCL12 est capable de réguler directement la quiescence par l'induction des protéines inhibitrices du cycle cellulaires dont p57. Dans ce contexte, les CSH invalidées pour CXCR4 sont plus prolifératives et, par elle-même, cette hyperprolifération pourrait être à l'origine d'une augmentation des ROS qui ensuite entraîne l'épuisement prématuré des CSH.

Dans ce travail, nous avons voulu mieux comprendre les mécanismes de la déplétion des CSH chez les souris chimères reconstituées par des cellules de foie fœtal CXCR4^{+/+} ou CXCR4^{-/-} et avons émis l'hypothèse d'un rôle potentiel des ROS. Nous avons utilisé un modèle murin de reconstitution de l'hématopoïèse par des cellules de foie fœtal WT ou délétées constitutivement pour CXCR4. Nous avons également utilisé un modèle de génération de stress *in vitro* par des traitements de molécules oxydantes et tester le potentiel antioxydant du CXCL12.

Au total, ce travail a montré qu'en absence de la signalisation de CXCR4, les CSH et les progéniteurs ont un contenu en ROS anormalement élevé, entraînant une activation de p38MAPK, des cassures double brins d'ADN et une apoptose. Les niveaux accrus de ROS sont directement responsables de l'épuisement du pool des CSH et ne sont pas liés à la perte de quiescence des CSH CXCR4^{-/-}. Enfin, l'axe CXCR4/CXCL12 a une action directe sur la diminution des ROS induits par un stress oxydatif *in vitro*. Cette action s'exerce essentiellement au niveau mitochondrial. Ces données mettent en évidence l'importance de l'axe CXCR4/CXCL12 dans la régulation de la durée de vie des CSH en limitant la génération de ROS et le stress génotoxique.

Article 1 : L'axe CXCR4/CXCL12 s'oppose à l'épuisement des cellules souches hématopoïétiques par une protection sélective contre le stress oxydatif

Zhang Y^{1*}, **Dépond M^{1*}**, He L¹, Foudi A², Kwarteng EO¹, Lauret E³, Plo I¹, Desterke C⁴, Dessen P⁵, Fujii N⁶, Opolon P⁷, Herault O^{8,9}, Solary E¹, Vainchenker W¹, Joulin V¹, Louache F^{1,9,#}, Wittner M^{1,9,#}.

1 Paris-Saclay University, UMRS-1170, Gustave Roussy, Villejuif, France.

* Les auteurs ont contribué à parts égales dans ce travail

2 Paris-Saclay University, INSERM U935, Andre Lwoff Institute, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France.

3 Paris Descartes University, CNRS (UMR 8104), Inserm U1016, Institut Cochin, Paris, France.

4 Paris-Saclay University, UFR Medicine, INSERM UMS 33, Andre Lwoff Institute, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France.

5 Bioinformatic platform, UMS AMMICA, INSERM US23/CNRS UMS3665, Gustave Roussy, Villejuif, France.

6 Kyoto University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto, Japan.

7 Laboratoire de pathologie expérimentale, Gustave Roussy, Villejuif, France.

8 CNRS UMR 7292 GICC, Tours, France.

9 CNRS GDR 3697 MicroNiT, France.

Les auteurs ont supervisés conjointement ce travail

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

CXCR4/CXCL12 axis counteracts hematopoietic stem cell exhaustion through selective protection against oxidative stress

Received: 21 July 2016

Accepted: 02 November 2016

Published: 25 November 2016

Yanyan Zhang^{1,*}, Mallorie Dépond^{1,*}, Liang He¹, Adlen Foudi², Edward Owusu Kwarteng¹, Evelyne Lauret³, Isabelle Plo¹, Christophe Desterke⁴, Philippe Dessen⁵, Nobutaka Fujii⁶, Paule Opolon⁷, Olivier Herault^{8,9}, Eric Solary¹, William Vainchenker¹, Virginie Joulin¹, Fawzia Louache^{1,9,†} & Monika Wittner^{1,9,†}

Hematopoietic stem cells (HSCs) undergo self-renewal to maintain hematopoietic homeostasis for lifetime, which is regulated by the bone marrow (BM) microenvironment. The chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12 are critical factors supporting quiescence and BM retention of HSCs. Here, we report an unknown function of CXCR4/CXCL12 axis in the protection of HSCs against oxidative stress. Disruption of CXCR4 receptor in mice leads to increased endogenous production of reactive oxygen species (ROS), resulting in p38 MAPK activation, increased DNA double-strand breaks and apoptosis leading to marked reduction in HSC repopulating potential. Increased ROS levels are directly responsible for exhaustion of the HSC pool and are not linked to loss of quiescence of CXCR4-deficient HSCs. Furthermore, we report that CXCL12 has a direct rescue effect on oxidative stress-induced HSC damage at the mitochondrial level. These data highlight the importance of CXCR4/CXCL12 axis in the regulation of lifespan of HSCs by limiting ROS generation and genotoxic stress.

Reactive oxygen species (ROS) are produced during oxidative respiration or through exogenous environmental stresses, such as ionizing radiations or genotoxic treatments. Physiological concentrations of ROS play a role in signal transduction^{1,2}, but at high concentrations they can oxidize cell constituents leading to protein carbonylation, lipid peroxidation and DNA damage that activate multiple apoptosis pathways³.

By far, the most important source for ROS is mitochondria^{4,5} and their endogenous production as by-products of aerobic respiration is thought to be the cause of most oxidative damages observed in mammals and particularly during aging^{6,7}.

To avoid accumulation of oxidative stress, cells have evolved mechanisms to fine-tune ROS levels. They involve distinct groups of specialized proteins such as superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase. Reduced glutathione (GSH), which also exists in the cell in its oxidized form (GSSG), is considered as the most abundant molecule among endogenous antioxidants. Alteration in its redox status serves as an indicator of oxidative stress when antioxidant defense mechanisms are not completely efficient and is a common feature of ageing and many pathological situations including AIDS, neurodegenerative diseases and cancer.

Hematopoietic stem cells (HSCs) are defined as cells capable of both self-renewal and differentiation into any of the hematopoietic cell lineages, properties that allow hematopoietic reconstitution^{8,9}. Long-term maintenance of HSCs is precisely regulated by the equilibrium between proliferation and quiescence to maintain their numbers

¹Paris-Saclay University, UMRS-1170, Gustave Roussy, Villejuif, France. ²Paris-Saclay University, INSERM U935, Andre Lwoff Institute, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France. ³Paris Descartes University, CNRS (UMR 8104), Inserm U1016, Institut Cochin, Paris, France. ⁴Paris-Saclay University, UFR Medicine, INSERM UMS 33, Andre Lwoff Institute, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France. ⁵Bioinformatic platform, UMS AMMICA, INSERM US23/ CNRS UMS3665, Gustave Roussy, Villejuif, France. ⁶Kyoto University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto, Japan. ⁷Laboratoire de pathologie expérimentale, Gustave Roussy, Villejuif, France. ⁸CNRS UMR 7292 GICC, Tours, France. ⁹CNRS GDR 3697 MicroNiT, France. *These authors contributed equally to this work. †These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.L. (email: Fawzia.LOUACHE@gustaveroussy.fr)

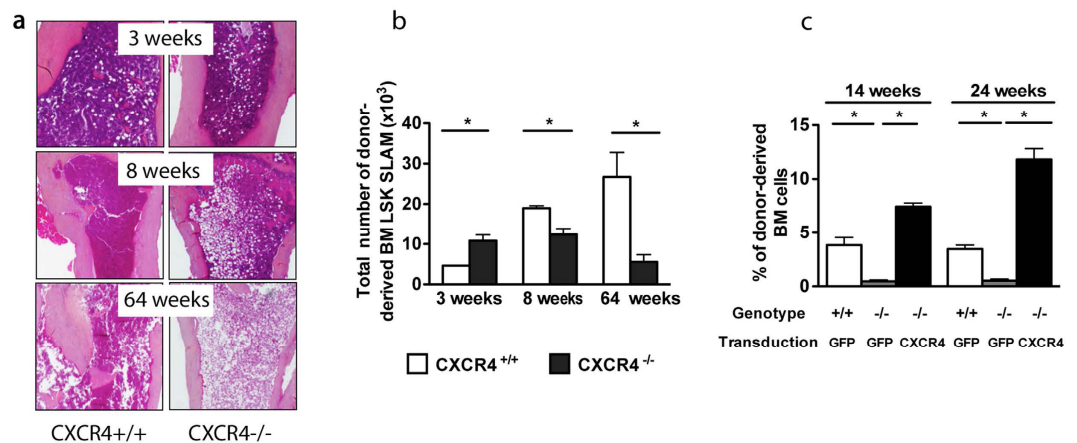


Figure 1. Defective hematopoiesis in BM of *CXCR4*^{-/-} chimeras. (a) BM sections from *CXCR4*^{+/+} and *CXCR4*^{-/-} chimeras were stained with hematoxylin/eosin/safran. Chimeric mice were analyzed 3, 8 and 64 weeks after engraftment of eight-week-old, lethally irradiated mice with 5×10^6 *CXCR4*^{+/+} or *CXCR4*^{-/-} FL cells. (b) Total donor-derived LSK-SLAM cell numbers in BM. Mean \pm SEM from 3 independent experiments (5–7 mice per group). (c) Restored hematopoietic reconstitution potential by retroviral expression of *CXCR4* in *CXCR4*^{-/-} HSCs. Mean \pm SEM of the percentages of donor-derived BM cells 14 and 24 weeks post engraftment. Data represent a pool from 8 mice over two independent experiments.

and lifespan. Defects in these processes lead to hematopoietic insufficiencies and to the development of hematopoietic malignancies.

A low level of ROS is a hallmark of primitive HSCs, and moderate, physiological elevation in ROS levels in these cells enhances motility, short-term repopulation and repair processes^{10,11}. However, when ROS are excessively elevated, they lead to irreversible damage, such as senescence and apoptosis resulting in premature exhaustion of HSC self-renewal. In line with this, disruption of oxidative stress-regulating pathways in *Atm*^{-/-} mice leads to premature HSC exhaustion due to loss of quiescence and decline in their self-renewal capacity¹². Moreover, it has been reported that the antioxidant enzyme GPx-3 is a determinant of self-renewal of HSCs¹³. Increased ROS levels, as a result of mitochondrial dysfunction^{14,15} or achieved by deletion of antioxidant stress genes such as FOXOs¹⁶ or BMI¹⁷, have been shown to influence HSC differentiation and long-term maintenance. As ROS elevation results in DNA damage, they may contribute to genomic instability¹⁸ and accumulation of mutations and deletion that may lead to cancer¹⁹. Conversely, extremely low ROS levels result in defects in differentiation and repopulation capacity²⁰. Thus, ‘balanced ROS levels’ appear to be essential for long-term functions of HSCs. However, the molecular mechanisms that regulate ROS levels and oxidative stress responses are poorly understood.

HSCs are localized in a microenvironment known as the stem cell “niche,” where they are maintained in an undifferentiated and quiescent state by various types of niche-related factors^{21–23}. Within the niches, the chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1, also termed CXCL12) and its major receptor *CXCR4* expressed on HSCs are key factors. *CXCR4*/CXCL12 signaling influences many aspects of HSPC biology including migration, retention within stem cell niches, proliferation and quiescence^{24–28}. Nonetheless, its requirement for HSPC biology remains to be explored. Indeed, significant discrepancies were reported on the effects of *CXCR4* deletion regarding the long-term maintenance of the HSC pool using inducible mouse models. *CXCR4* deletion achieved with poly(I)-poly(C)-inducible Cre-transgenic mice, resulted in sharp deleterious effects on HSCs, whereas *CXCR4*^{-/-} HSC numbers were maintained in tamoxifen-inducible Cre-transgenic mice^{28,29}.

Here, we uncovered a specific function for *CXCR4*/CXCL12 axis in the prevention of ROS elevation, apoptosis and DNA damage in HSCs and provide missing links between *CXCR4*/CXCL12 pathway and ROS generation.

Results

Disruption of *CXCR4* receptor leads to progressive exhaustion of the adult BM HSC pool in *CXCR4*^{-/-} chimeras. Several studies have demonstrated that some chemical agents including tamoxifen or Poly(I)-Poly(C) used in conditional knockout experiments to induce gene deletion, may not be totally harmless to HSCs by direct interference with their proliferative state and ROS levels^{30,31}. Therefore, to avoid any caveats owing to chemical inducers, we chose to carry out this study by transplantation experiments using conventional *CXCR4* KO fetal liver (FL) cells in which *CXCR4* is constitutively inactive. Of note, it has been demonstrated that FL HSCs can reach an adult state between 4 to 5 weeks post transplant³². Using this approach, we have previously demonstrated that *CXCR4*^{-/-} FL cells have kept the potential to reconstitute hematopoiesis in lethally irradiated mice, albeit in the short term²⁶. To address whether *CXCR4*^{-/-} FL cells contribute to long-term hematopoiesis, we analyzed in more depth the HSPC compartment of chimeric mice reconstituted either with CD45.2⁺ *CXCR4*^{-/-} or *CXCR4*^{+/+} FL cells over time. The origin of hematopoietic cells in the BM, spleen and peripheral blood (PB) of these chimeric mice was evaluated by dual labeling with antibodies against CD45.1 (host) and CD45.2 (donor). *CXCR4*^{-/-} chimeric mice displayed a progressive yet marked decrease in BM cellularity over time in comparison

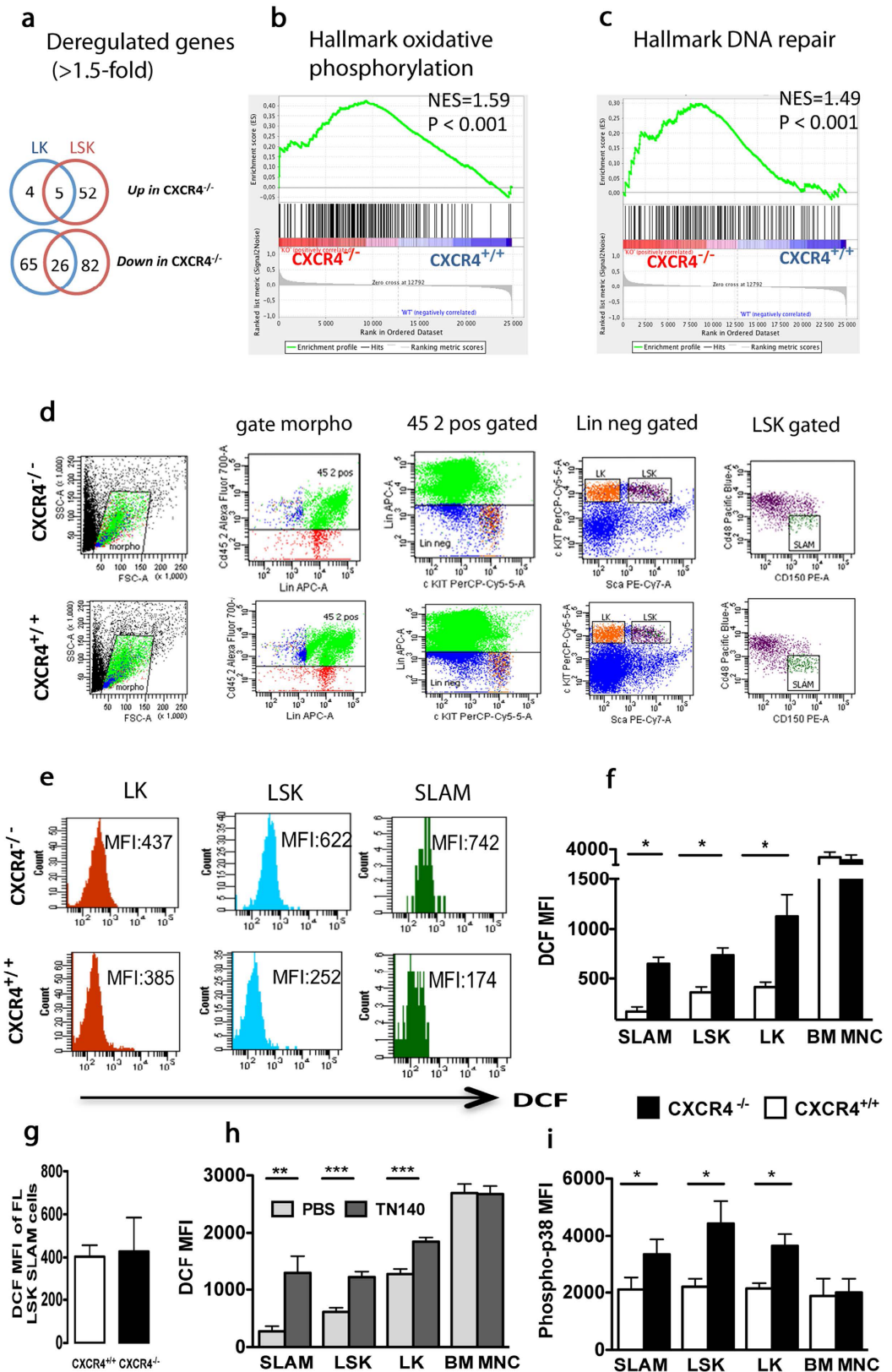


Figure 2. Increased endogenous ROS production in BM of $CXCR4^{-/-}$ chimeras. (a) Whole genome microarray analysis of $CXCR4^{-/-}$ and $CXCR4^{+/+}$ LK and LSK cells. Venn diagrams show number of differentially expressed genes that are at least 1.5-fold changed. (b,c) GSEA of $CXCR4^{-/-}$ and $CXCR4^{+/+}$ LSK cells showing significant enrichment of Hallmark Oxidative phosphorylation (b) and Hallmark DNA Repair (c) gene sets in $CXCR4^{-/-}$ cells. (d) Full gating strategy with actual staining plots for immunophenotypic analysis of HSCs from $CXCR4^{+/+}$ and $CXCR4^{-/-}$ chimeras performed 10 weeks after FL cell transplantation.

(e) Mean Fluorescence Intensity (MFI) of DCF on BM progenitor cells from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras according to the gating strategy described in (d). DCF staining showed increased intracellular ROS in CXCR4^{-/-} LT-HSCs and HSPCs. Data are representative of 6 independent experiments. (f) DCF MFI of donor-derived LSK-SLAM (SLAM), LSK, LK and BM mononuclear (BM MNC) cells. Mean \pm SEM from 6 mice per group, pooled from 2 experiments. (g) DCF MFI of LSK-SLAM cells from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} FL cells. Data from 3 independent experiments are shown. (h) Increased intracellular ROS in ten-week-old WT mice treated with CXCR4 antagonist TN140. Mean DCF MFI \pm SEM from 6 mice per experiment in 2 independent experiments. (i) Increased phosphorylation of p38 MAPK in CXCR4^{-/-} HSPCs. Mean phospho-p38 MFI \pm SEM in donor-derived LSK-SLAM, LSK, LK and BM mononuclear (BM-MNC) fractions. Data from 8 mice per group over 2 independent experiments are shown. CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} cells were obtained from chimeric mice 10 weeks after FL cell transplantation.

to CXCR4^{+/+} chimeras (Fig. 1a). This decrease was noticeable starting at 8 weeks post-transplantation and was profound after one year of reconstitution (Fig. 1a). Concomitantly, after an initial increase (3 weeks), the number of CXCR4^{-/-} BM enriched long-term HSCs (LSK-SLAM: Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺CD150⁺CD48⁻CD41⁻) significantly decreased over time (Fig. 1b). This BM HSC exhaustion was accompanied by a long-term deficit in BM progenitor content (Supplementary Figure S1a) and an early and sustained increase in splenic HSPC-enriched LSK (Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺) and colony forming cells (CFC) (Supplementary Figure S1b, S1c). Notably, not only did we observe a dramatic increase in the number of donor-derived LSK cells in the peripheral blood (PB) of CXCR4^{-/-} chimeras, as has been reported before^{24,26}, but also the presence of LSK-SLAM cells was observed (Supplementary Figure S1d, S1e). Furthermore, to determine whether the BM of CXCR4^{-/-} chimeric mice contained genuine LT-HSCs capable of long-term reconstitution, we performed rescue experiments. Three months after transplantation, donor-derived BM cells from CXCR4^{-/-} chimeras were transduced with retrovirus encoding full length CXCR4 or GFP and injected into secondary recipients. As shown in Fig. 1c, CXCR4^{-/-} cells displayed a marked decrease in their hematopoietic repopulating capacities in comparison to CXCR4^{+/+} cells (^{-/-}GFP vs. ^{+/+}GFP). This defect was, however, totally rescued by the re-expression of CXCR4 (^{-/-}GFP vs. ^{-/-}CXCR4). In addition, the reconstitution fitness of ^{-/-}CXCR4 cells was even higher than controls (^{-/-}GFP vs. ^{+/+}CXCR4). These results demonstrate that CXCR4^{-/-} HSCs from chimeric mice exhibit a cell autonomous long-term reconstitution defect that can be rescued by expression of CXCR4.

HSPCs of CXCR4^{-/-} chimeras exhibit increased oxidative stress. To shed light on the molecular pathways regulated by CXCR4/CXCL12 axis, we assessed genome-wide mRNA expression in CXCR4^{-/-} and CXCR4^{+/+} HSPCs sorted from chimeric mice. Since we failed to isolate sufficient numbers of CXCR4^{-/-} LSK-SLAM cells, we analyzed LSK and myeloid progenitors (LK, Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺) cells. Significance Analysis of Microarray (SAM; pubmed#11309499) identified 165 and 100 differentially expressed genes in LSK and LK cells, respectively (>1.5-fold change; FDR <5%) (Fig. 2a). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA; MsigDB 5.1) revealed that hallmarks of oxidative phosphorylation and DNA repair were significantly enriched in CXCR4^{-/-} LSK cells (Fig. 2b,c). Using 5-(and 6)-chloromethyl-2'-7'-dichlorofluorescein-diacetate (CM-H₂DCF DA) staining and immunophenotypic analysis of BM progenitor cells from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras according to the gating strategy described in Fig. 2d, we confirmed elevated ROS levels in CXCR4^{-/-} HSPCs. As shown in Fig. 2e,f, ROS levels were significantly increased in LK, LSK and LSK-SLAM from CXCR4^{-/-} BM compared to CXCR4^{+/+} BM cells. In contrast, no differences were observed in mature BM cells (Fig. 2f) and in LSK-SLAM cells directly obtained from FL of CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} embryos (Fig. 2g). To study whether CXCR4 functions on ROS regulation could be recapitulated by another strategy of inhibition, we evaluated the effects of CXCR4 antagonist 4F-benzoyl-TN14003 (TN140) on ROS levels in ten-week-old wild type mice. Similarly to CXCR4^{-/-} cells, LSK-SLAM, LSK and LK cells from wild type treated mice showed increased endogenous ROS levels (Fig. 2h). Thus, CXCR4 receptor disruption results in increased oxidative stress, specifically encountered in HSPCs. Stress-activated p38 MAPK is involved in different situations including oxidative stress¹². Flow cytometry analysis of CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} BM at 8 weeks after transplantation revealed that phosphorylation of p38 MAPK was significantly enhanced in LSK-SLAM, LSK and LK cells of BM from CXCR4^{-/-} chimeras compared to CXCR4^{+/+} counterparts (Fig. 2i). No activation of the p38 MAPK pathway was observed in differentiated BM cell populations of CXCR4^{-/-} chimeras (Fig. 2i).

In vivo treatment with ROS scavenger N-acetyl-L-cysteine prevents apoptosis and DNA double-strand breaks in HSPCs from CXCR4^{-/-} chimeras. To assess whether high ROS levels were responsible for the observed functional deficiencies of CXCR4^{-/-} HSPCs, CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras were treated for one month with the permeant thiol N-acetyl-L-cysteine (NAC), which acts as an antioxidant agent. NAC treatment specifically diminished elevated ROS levels in LSK-SLAM, LSK and LK BM populations of CXCR4^{-/-} chimeras (Fig. 3a–c) but not in mature cells (Fig. 3d). The NAC-mediated decrease in ROS levels in CXCR4^{-/-} HSPCs correlated with an important decrease in p38 MAPK phosphorylation (Fig. 3e–g). No significant changes were observed in CXCR4^{+/+} HSPC populations. A high percentage of Annexin-V⁺ cells was detected in CXCR4^{-/-} LSK and LK populations compared to CXCR4^{+/+} counterparts. This substantial apoptosis was almost completely reverted by NAC treatment *in vivo* (Fig. 3h,i). Analysis of the level of γ H2AX foci, a biomarker of DNA double-strand breaks revealed a significant increase in DNA damage in sorted CXCR4^{-/-} LSK cells compared to controls, and this phenomenon was entirely reverted by NAC treatment *in vivo* (Fig. 3j,k).

In vivo treatment with the antioxidant NAC ameliorates the functional deficit of CXCR4^{-/-} HSPCs without influencing their proliferative state. CXCR4 and CXCL12 have previously been

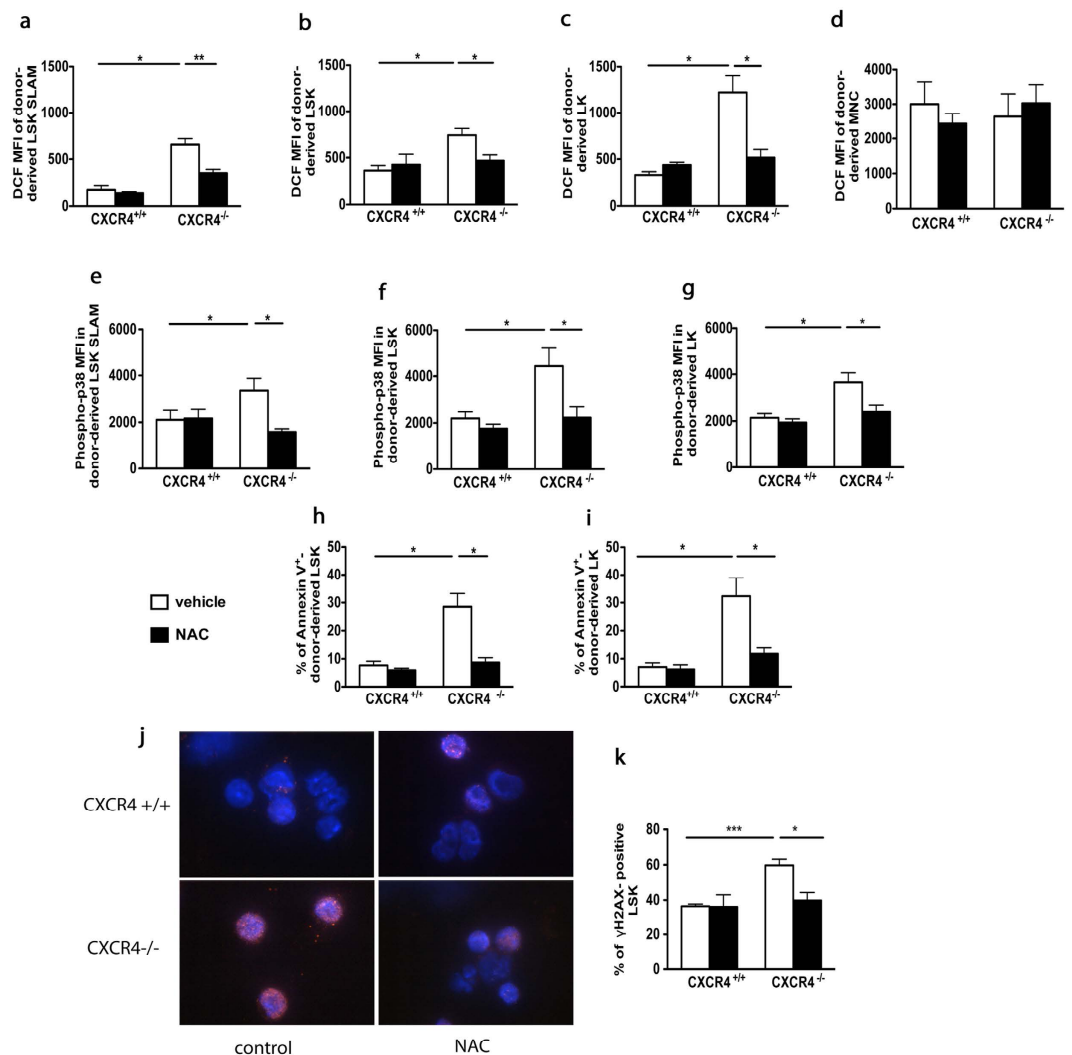


Figure 3. Defects in $CXCR4^{-/-}$ HSPC function are counteracted by the antioxidant NAC. (a–d) DCF MFIs of donor-derived BM subsets of $CXCR4^{+/+}$ and $CXCR4^{-/-}$ chimeras treated with NAC or vehicle. Mean \pm SEM from 6 mice per group pooled from three independent experiments. (e–g) Phospho-p38 MFIs in different BM subsets. Mean \pm SEM from 6 mice per group pooled from 3 independent experiments. (h,i) Percentages of Annexin-V⁺ cells in BM LSK and LK cells. Mean \pm SEM from 8 mice per group pooled from 2 independent experiments. (j) Representative γ H2AX staining (red) in BM LSK cells of $CXCR4^{+/+}$ and $CXCR4^{-/-}$ chimeras. Nuclei were stained with DAPI (blue). (k) Frequencies of γ H2AX-positive BM LSK cells. More than 100 cells were counted per group in 3 independent experiments. Mean \pm SEM from 3 independent experiments with 3 to 5 mice per group.

shown to play a crucial role in regulating HSC quiescence, and their deficiencies had been associated with quiescence loss, correlating with decreased hematopoietic potential^{28,29}. On the other hand, ROS were shown to drive HSCs into cell cycle^{15,33}. To assess whether the quiescence loss of $CXCR4^{-/-}$ HSCs was related to increased ROS levels, we treated $CXCR4^{+/+}$ and $CXCR4^{-/-}$ chimeras for one month with NAC and evaluated HSC proliferation *in vivo*. In baseline conditions, 48% of $CXCR4^{-/-}$ LSK-SLAM cells had incorporated BrdU over a four-day-period, whereas only 18% of $CXCR4^{+/+}$ LSK-SLAM cells were labeled with BrdU (Fig. 4a), supporting the idea that $CXCR4^{-/-}$ HSPCs are cycling. Similar results were obtained with donor-derived LSK cells (Fig. 4b). However, after NAC treatment, $CXCR4^{-/-}$ LSK-SLAM and LSK cells remained highly proliferative (Fig. 4a,b), indicating that elevated ROS levels are not the primary cause of the defect of $CXCR4^{-/-}$ HSC quiescence.

We next asked whether NAC treatment could counteract the hematopoietic deficit observed in $CXCR4^{-/-}$ chimeras. The total number of $CXCR4^{-/-}$ LSK-SLAM cells was significantly higher after NAC treatment of $CXCR4^{-/-}$ chimeras (Fig. 4c), whereas the same treatment did not affect $CXCR4^{+/+}$ LSK-SLAM cells. A similar result was observed for CFC progenitors (Fig. 4d). Consistent with an increase in the BM $CXCR4^{-/-}$ HSPC pool, a concomitant increase in circulating and splenic progenitors was also noticed upon NAC treatment (Fig. 4e,f). Thus, treatment of $CXCR4^{-/-}$ chimeras with NAC could partially counteract the decrease in the number of BM HSPCs, indicating that elevated endogenous ROS contributes to $CXCR4^{-/-}$ HSPCs defects.

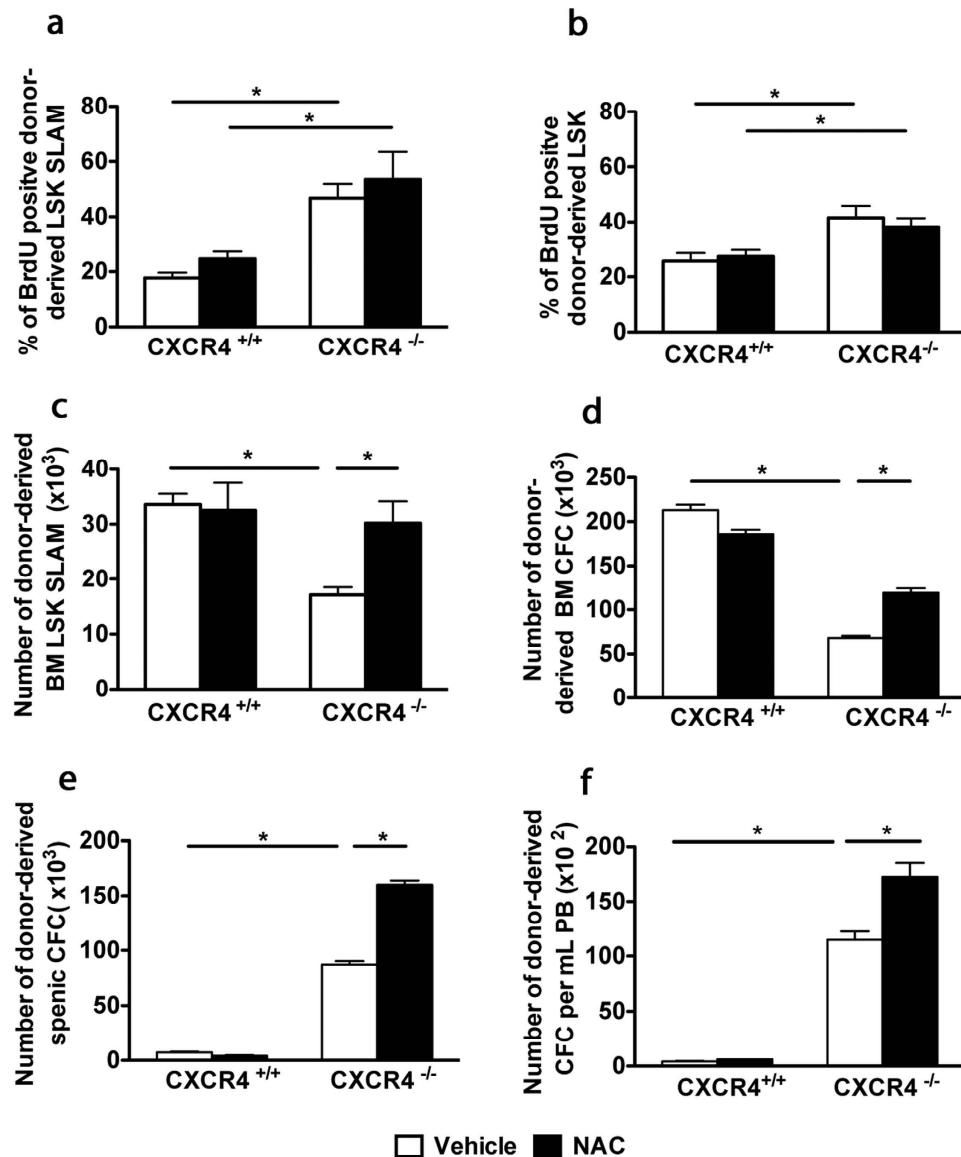


Figure 4. *In vivo* treatment with NAC ameliorates the functional deficit of CXCR4^{-/-} HSPCs without influencing their proliferative status. (a,b) CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras were treated with NAC or vehicle, BrdU⁺ cell frequencies in BM LSK-SLAM and LSK subsets. Data represent mean \pm SEM from 6 mice per group pooled from 2 independent experiments. (c) Total number of BM LSK-SLAM cells. Data represent mean \pm SEM from 8 mice per group, pooled from 2 independent experiments. (d–f) Restoration of total CFC numbers after NAC-treatment in BM, spleen and peripheral blood (PB). Mean \pm SEM of colonies scored for 6 samples per group of 2 independent experiments performed in duplicate.

CXCR4/CXCL12 axis prevents buthionine sulfoximine-induced oxidative stress in HSPCs. In the bone marrow stem cell niche, ROS regulation is complex. To test whether ROS regulation by CXCR4/CXCL12 signaling could be recapitulated *in vitro*, we used buthionine sulfoximine (BSO), a glutathione (GSH)-depleting agent. BSO was previously shown to promote oxidative stress in HSCs thus shortening their lifespan^{12,34,35}. When sorted WT LSK cells were treated for 48 hr with different BSO concentrations, we detected a dose-dependent increase in ROS levels with a maximal effect at 100 μ M (Supplementary Figure S2a). Addition of CXCL12 or NAC to the culture medium did not modify baseline ROS levels, but significantly decreased BSO-induced ROS (Fig. 5a). This effect was detected at CXCL12 concentrations as low as 2 ng/mL (Supplementary Figure S2b). As expected, BSO induced a sharp decrease in the GSH/GSSG ratio, indicating an important cellular depletion in glutathione (Supplementary Figure S2c). Of note, this decrease was still observed in the presence of CXCL12, indicating that the rescue effect of CXCL12 on ROS did not depend on the glutathione pathway (Supplementary Figure S2c). The increase in the percentage of apoptotic (Fig. 5b) and γ H2AX foci-expressing LSK cells (Fig. 5c,d) observed in presence of BSO, were lowered by CXCL12 or NAC. In addition, CXCL12 and NAC rescued the deleterious effects of BSO on both, cell proliferation and colony-forming capacity of LSK cells (Fig. 5e,f, Supplementary Figure S2d, S2e).

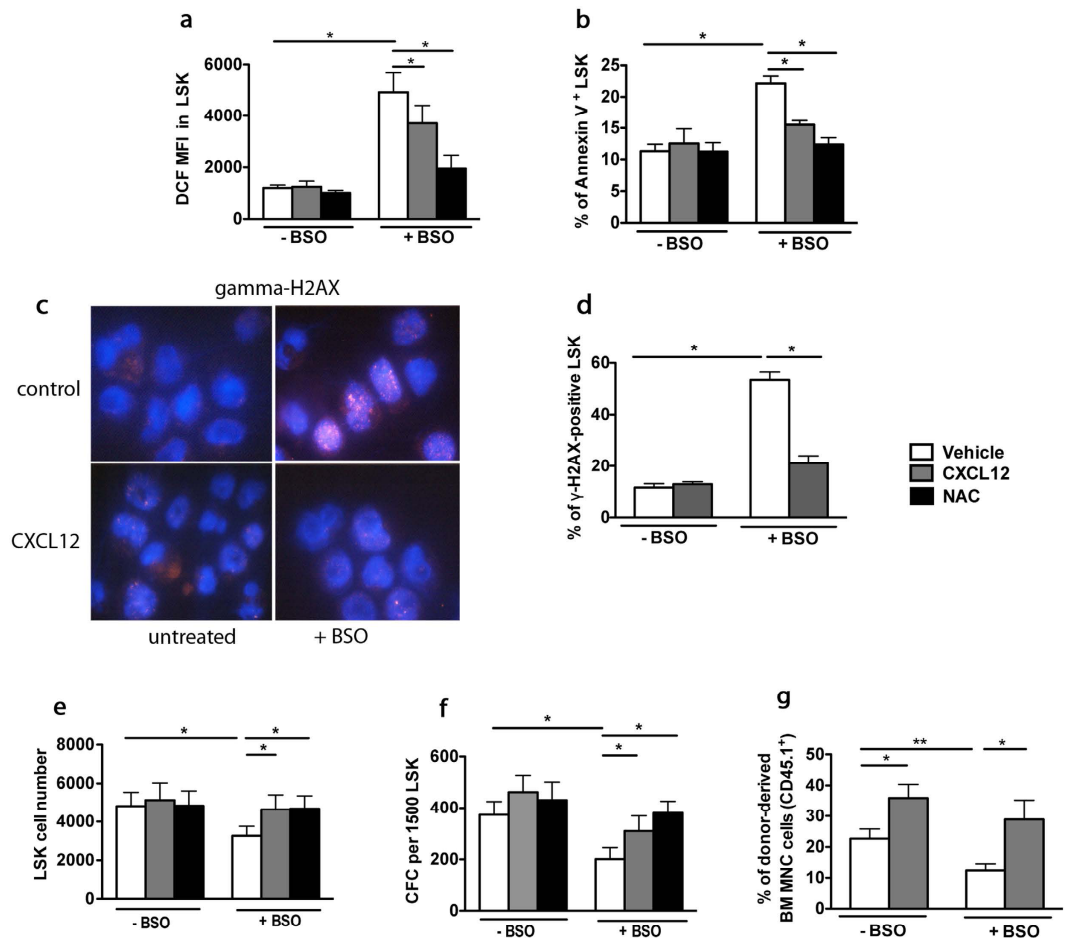


Figure 5. CXCR4/CXCL12 axis prevents BSO-induced oxidative stress in HSCs. (a) DCF MFIs of sorted WT LSK cells cultured for 48 hr with vehicle or BSO, in the absence or presence of 100 ng/mL CXCL12 or 2 mM NAC. Mean \pm SEM, $n = 6$. (b) Annexin-V staining of LSK cells. Mean \pm SEM, $n = 3$. (c) γ -H2AX-staining of LSK cells cultured for 48 hr in the absence (vehicle) or presence of BSO and CXCL12. Representative pictures are shown. (d) Percentages of γ -H2AX-positive LSK cells. More than 100 cells were counted per group in 3 independent experiments. (e) Effect of BSO-treatment on LSK proliferation. Mean \pm SEM, $n = 4$. (f) Colony numbers (CFC) from LSK cells. Mean \pm SEM of colonies from 5 independent experiments performed in duplicate. (g) CXCL12 rescues compromised hematopoietic long-term reconstitution with BSO-treated LSK cells. Before transplantation into lethally irradiated WT CD45.2⁺ recipients, CD45.1⁺ LSK cells were treated with BSO for 48 hr in the absence or presence of CXCL12. Mean \pm SEM of percentages of CD45.1⁺ donor-derived cells 6 months after transplantation from the pool (10 mice) independent experiments.

Finally, we studied the effect of CXCL12 on the hematopoietic repopulation capacity of BSO-treated LSK cells, evaluated 6 months after transplantation. CXCL12 addition did slightly, yet significantly increase the hematopoietic reconstitution potential of LSK cells under baseline conditions. Even more, it remarkably counteracted the deleterious effects of BSO (Fig. 5g). The rescued reconstitution capacity of BSO-treated HSCs was confirmed by the detection of donor-derived B cells, T cells and myeloid cells in recipient mice (data not shown). Altogether, these results show that CXCR4/CXCL12 axis has an important role in the protection of HSCs against oxidative stress.

CXCR4^{-/-} HSPCs cells exhibit increased sensitivity to oxidative stress induction. As CXCR4^{-/-} HSPCs are characterized by elevated endogenous ROS levels compared to CXCR4^{+/+} counterparts, we explored the possibility that they could be particularly vulnerable to additional oxidative stress. Sorted CD45.2⁺ BM cells from ten-week-old CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras were treated *in vitro* for 24 hours with a suboptimal dose of BSO (10 μ M) and then seeded in semi-solid culture. Strikingly, whereas this low concentration of BSO had no impact on CXCR4^{+/+} cells, it reduced the number of CXCR4^{-/-} progenitors by about 50% (Fig. 6a). Furthermore, ROS levels were increased in all CXCR4^{-/-} BM cell subsets, including LSK-SLAM, LK and BM mononuclear cells (Fig. 6b–d) to a higher degree than in their CXCR4^{+/+} counterparts (Fig. 6e–g). CXCL12 addition had no effect on basal ROS levels, but resulted in substantial reduction of ROS levels in BSO-treated CXCR4^{+/+} cells, but had no effect on CXCR4^{-/-} cells (Fig. 6b–g). As these results indicate that CXCR4^{-/-} progenitors are more amenable to oxidative stress induction, we interrogated whether glutathione, the major cellular antioxidant reservoir, was altered in CXCR4^{-/-} cells. As shown in Fig. 6h, the GSH/GSSG ratio was significantly lower in CXCR4^{-/-} LSK

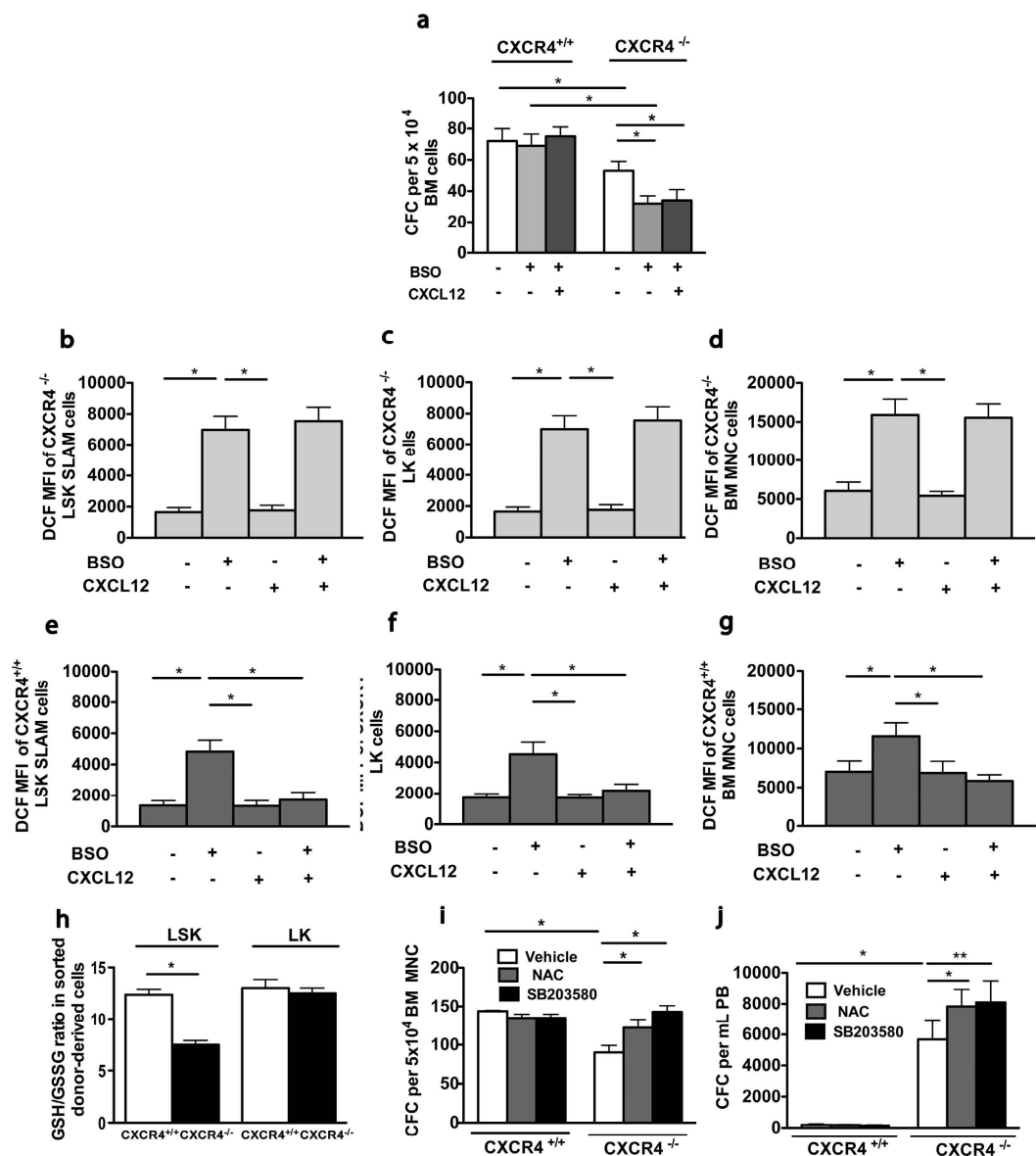


Figure 6. CXCR4^{-/-} HSPCs exhibit enhanced sensitivity to oxidative stress. Donor-derived BM cells from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras 6 weeks post transplantation were sorted and cultured for 24 hr in the presence of a low BSO concentration (10 μM), with or without CXCL12. **(a)** Colony formation. Mean ± SEM of 3 independent experiments performed in duplicate. **(b–d)** DCF MFIs on CXCR4^{-/-} BM LSK-SLAM **(b)**, LK **(c)** and BM-MNC cells **(d)**. **(e–g)** DCF MFIs on CXCR4^{+/+} BM LSK-SLAM **(e)**, LK **(f)** and BM-MNC cells **(g)**. Mean ± SEM of 3 independent experiments, with 3 mice per group. **(h)** GSH/GSSG ratios in sorted LSK and LK cells from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras, 6 weeks after transplantation. Mean ± SEM of 3 independent experiments performed in triplicate, with 4 mice per group. **(i,j)** CFC frequencies in sorted CD45.2⁺ BM and in peripheral blood cells from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras determined 3 months after transplantation. Sorted cells were plated with vehicle, NAC (2 mM) or p38 MAPK inhibitor SB203580 (25 μM). Mean ± SEM of 3 independent experiments performed in duplicate.

BM cells, compared to CXCR4^{+/+} counterparts. This was specific for CXCR4^{-/-} LSK cells, as the GSH/GSSG ratio was unchanged in CXCR4^{-/-} LK cells with respect to CXCR4^{+/+} LK cells. In line with a low antioxidant reservoir in CXCR4^{-/-} LSK cells, the expression of several genes encoding ROS-detoxifying enzymes, such as Prdx1, Txn2, Gpx3 (Supplementary Figure S3a) and the NRF2 nuclear targets, *Hmox1* and *Nqo1*, (Supplementary Figure S3b), were overexpressed in LSK cells of CXCR4^{-/-} chimeras compared to CXCR4^{+/+} chimeras. These results are in line with the notion that reactive intracellular defense mechanisms are frequently induced in response to a low cellular antioxidant status.

Recent studies have indicated that oxidative stress induced by culture in ambient air compromises the survival of mouse and human HSPCs³⁶. We thus addressed the question, whether CXCR4 deficiency resulted in an increased sensitivity to *in vitro* culture. The number of clonogenic progenitors that had grown from CD45.2⁺ BM

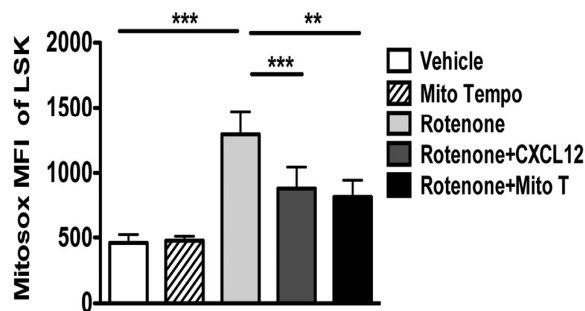


Figure 7. Mitochondria are targets for CXCL12 in oxidative stress control. CXCL12 or the mitochondrial ROS scavenger Mito Tempo reduces Mitosox Red MFI in sorted LSK cells. Cells were treated with rotenone (5 μ M) or vehicle for 1 hour in absence or presence of CXCL12 (10 ng/ml) or Mito Tempo (2 μ M). Mean \pm SEM of 3–7 independent experiments.

cells of CXCR4^{-/-} chimeras, was lower compared to CXCR4^{+/+} counterparts and NAC addition resulted in an increase in CXCR4^{-/-} progenitor cell numbers (Fig. 6i). Similarly, the number of progenitor cells that had grown from CXCR4^{-/-} PB also increased, when NAC was added to the culture medium (Fig. 6j). Furthermore, addition of the p38 MAPK inhibitor SB203580 increased BM and PB colony-forming capacity of CXCR4^{-/-} cells (Fig. 6i,j). Altogether, these results suggest that CXCR4^{-/-} HSPCs are more vulnerable to oxidative stress induced by *in vitro* culture and that activated p38 MAPK pathway is involved in this phenomenon.

Mitochondria of HSPCs are targets for CXCL12 in oxidative stress control. Oxidative damage by ROS generated in mitochondria is a potent cause of HSC dysregulation^{37,38}. We thus tested, whether CXCL12 could regulate mitochondrial oxidative stress, by treating WT LSK cells with rotenone, a specific inhibitor of the complex I of the mitochondrial electron transport chain³⁹. Rotenone significantly increased mitochondrial ROS levels, as detected by MitoSOX Red, an effect that could be prevented by preincubation with the mitochondrial ROS scavenger Mito Tempo (Fig. 7). Strikingly, CXCL12 also lowered MitoSOX Red staining (Fig. 7), suggesting that CXCL12 can rescue ROS at the mitochondrial level.

Discussion

Although the management of ROS elevation in HSCs was proposed to be crucial for the maintenance of lifelong hematopoiesis, little is known about the processes by which HSCs deal with oxidative stress situations. Here, we demonstrate for the first time that CXCR4/CXCL12 axis can limit oxidative stress injury in HSCs by reducing mitochondrial oxidative stress.

CXCR4 signaling influences many aspects of HSPC biology including migration, retention within stem cell niches, proliferation and quiescence. Nonetheless, its requirement for HSPC biology remains to be explored. Furthermore, significant discrepancies were reported on the effects of CXCR4 deletion regarding the long-term maintenance of the HSC pool, using inducible mouse models. Indeed, CXCR4 deletion achieved with poly(I)-poly(C)-inducible Cre-transgenic mice, resulted in sharp deleterious effects on HSCs, whereas CXCR4^{-/-} HSC numbers were maintained in tamoxifen-inducible Cre-transgenic mice^{28,29}. These discrepancies may relate to effects of poly(I)-poly(C) or tamoxifen that may alter baseline HSPC numbers by inducing proliferation and eventually apoptosis even in the absence of any genetic modifications^{40,41}.

To answer the question if and how the absence of CXCR4 leads to alterations in HSC long-term maintenance, we used a CXCR4^{-/-} mouse syngenic transplantation model with CXCR4^{-/-} FL cells. This model has the advantage to be constitutive and not to use inducers that may interact with HSPC biology. Using this model, we have previously shown that CXCR4^{-/-} HSPCs have a marked defect in radioprotection of lethally irradiated mice and demonstrated the crucial role of CXCR4 in the retention of HSPCs in the BM microenvironment of chimeric mice²⁶. Here, we revealed a progressive depletion of LT-HSCs in the BM of chimeric CXCR4^{-/-} mice that correlates with an elevation of their endogenous ROS levels. Interestingly, no differences in ROS levels could be detected between CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} FL HSCs, suggesting that ROS regulation by CXCR4/CXCL12 axis is specific to adult HSCs or to the site of hematopoiesis (bone marrow versus FL). The importance of CXCR4 on ROS levels was demonstrated mostly using the transplantation model of CXCR4^{-/-} and CXCR4^{+/+} FL cells. This model offers an advantage over CXCR4 inhibitor administration in that CXCR4 inhibitor may also target non-hematopoietic cells within the microenvironment. Therefore, its effects cannot be attributed solely to the direct inhibition of CXCR4 on hematopoietic cells. In addition, the use of CXCR4 inhibitors is limited by their low stability. Importantly, despite these limitations, we have demonstrated an elevation in endogenous ROS levels in both, CXCR4^{-/-} transplanted HSCs and upon CXCR4 inhibitor administration. Thus, the observed increases of ROS levels in CXCR4^{-/-} HSPCs might not only reflect an altered cellular response to the stress inflicted by transplantation of FL CXCR4^{-/-} cells into irradiated mice. It will be of interest in future studies to establish, whether more stable CXCR4 inhibitor administration could also result in p38 MAPK phosphorylation and apoptosis.

Elevated ROS levels have been reported to limit the lifespan of HSCs in *Atm*^{-/-33} and *Fox3a*^{-/-42} mice. Indeed, we have demonstrated that *in vivo* administration of the antioxidant NAC to CXCR4^{-/-} chimeric mice

partially rescued their progressive hematopoietic deficit. Since increased ROS levels in CXCR4^{-/-} HSPCs were associated with an activation of the p38 MAPK pathway, it is likely that this pathway is involved in the deleterious consequences on progenitor growth and hematopoietic reconstitution capacity. In line with this, we showed that *in vitro* addition of the p38 MAPK inhibitor SB203580 rescued the low biological activity of clonogenic progenitors and LSK-SLAM cells from CXCR4^{-/-} chimeras.

Strikingly, the substantial increase in proliferation of CXCR4^{-/-} HSCs was not reversed by *in vivo* NAC administration, although there was a significant NAC effect on the replenishment of the HSC pool, associated with decreased apoptosis and DNA damage. This positions ROS as upstream effectors of apoptosis, DNA damage and loss of long-term maintenance in CXCR4^{-/-} HSCs. This contrasts with Atm^{-/-} mice, in which cell cycle regulation of HSCs was shown to be downstream to ROS production¹². Thus, absence of ROS effect on the cell cycle status of HSPCs is in line with data showing that CXCR4/CXCL12 axis directly acts on the cell cycle by regulation of p57^{kip2}²⁹. Importantly, the *in vivo* antioxidant treatment delayed the exhaustion of the CXCR4^{-/-} HSC pool without rescuing HSC quiescence, suggesting that increased ROS level is the primary determinant for HSC exhaustion, in some way independently of the cell cycle status and that proliferation by itself does not necessarily result in exhaustion of hematopoietic stem cell function.

Our experiments established that ROS production in HSPCs of CXCR4^{-/-} chimeras impacts their survival and long-term maintenance in a cell autonomous manner. This elevated ROS production may also impact in a paracrine manner normal hematopoiesis and the bone marrow microenvironment. In this regard, it will be interesting to investigate whether an abnormal microenvironment had developed in CXCR4^{-/-} chimeras and whether this may result in abnormalities in hematopoiesis. Of note, long-term hematopoietic reconstitution, in a competitive context between CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} HSPCs is dominated by normal hematopoiesis (even with an excess of CXCR4^{-/-}), suggesting a small if any impact of ROS production by CXCR4^{-/-} cells on normal hematopoiesis^{24,26}.

Excessive ROS production in CXCR4^{-/-} was associated with an upregulation of several ROS-detoxifying enzymes, that may reflect the challenged status of CXCR4^{-/-} cells in dealing with oxidative stress. Detoxification of ROS and repair of oxidatively-damaged proteins depend primarily on the availability of reduced glutathione, whose loss is an early hallmark of the progression of cell death in response to stress stimuli⁴³. Of note, LSK cells from CXCR4^{-/-} chimeras demonstrated a low intracellular reservoir of reduced glutathione, indicating a reduced cellular redox-buffering ability. In line with this, CXCR4^{-/-} LSK cells showed an increased sensitivity to additional stress situations, such as those induced by *in vitro* culture.

Previous studies have demonstrated that global expression of CXCL12 transgene in mice caused an upregulation of mitochondrial mass, but low mitochondrial activity in LSK cells. However, these studies did not address the direct effect of CXCL12 on mitochondrial oxidative stress⁴⁴. We addressed this point using *in vitro* studies and established that CXCL12 could indeed reduce mitochondrial ROS in murine HSPCs. Although the paucity of HSCs, particularly observed in CXCR4^{-/-} chimeras, challenged the analysis of mitochondrial ROS in CXCR4^{-/-} cells, these results indicate that CXCL12 could help in reducing ROS levels by lowering mitochondrial activity in murine HSPCs. The relationship between CXCL12 and the control of mitochondrial activity remains to be clarified.

Of note, CXCL12 protective effects against oxidative stress have been observed in culture systems containing cytokines that induce proliferation in LSK cells, demonstrating the importance of CXCR4/CXCL12 signaling in the regulation of intracellular ROS levels under proliferative conditions. This could be of particular relevance under physiological activation, such as bleeding or stress circumstances in which HSCs have to leave their hypoxic niches and to switch from dormancy to a metabolically active state^{40,45}. For instance, the stress-induced mobilization of HSPCs by G-CSF is in part related to ROS elevation resulting from c-Met activity¹¹. This mobilization is associated with CXCL12 underproduction and an increased apoptotic rate of mobilized cells compared to their steady-state BM counterparts⁴⁶. Thus, it is possible and indeed likely, that CXCL12 treatment during mobilization will improve the recovery of HSPCs and prevent their apoptosis by inhibiting endogenous ROS production.

In conclusion, this study underscore the protective role of CXCR4/CXCL12 axis and environmental BM signals to limit oxidative stress and their active participation in the maintenance of the HSC pool. This study hence opens avenues of research for the association of CXCR4 antagonists with antioxidant agents to decrease deleterious ROS effects, which are associated with stress hematopoiesis such as mobilization, bleeding and transplantation.

Methods

Adoptive transfer of FL cells and hematopoietic reconstitution. Mice were bred and maintained under specific pathogen free conditions with acidified water (pH 5.3) at the Animal Core Facility of Gustave Roussy Institute (n° E-94-076-11). Animal experiments were approved by Ethical Committee C2EA-26: Comité d'éthique en expérimentation animale de l'IRCIV moc.liamg@62aeec officially registered by the French Ministry of Research. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations and officially authorized by the French Ministry of Research (Permit number: 2012-23), as per Directive 2010/63 prescriptions and transposition into French law and regulations. The generation of CXCR4^{-/-} C57BL/6J-Ly5.2 mice and transplantation assays performed with FL cells from CXCR4^{-/-} and CXCR4^{+/+} embryos into lethally irradiated C57BL/6J-Ly5.1 mice were described previously²⁶. Briefly, 5 × 10⁶ CXCR4^{+/+} or CXCR4^{-/-} FL cells were injected into eight-week-old lethally irradiated mice and analyzed 3, 8 and 64 weeks after engraftment. C57BL/6J (Ly5.2 and Ly5.1) mice were purchased from Charles River and Harlan laboratories, respectively. Reconstituted chimeric mice (one month post engraftment) received 1 mg/mL N-acetyl-L-cysteine (NAC) in the drinking water during one month and were analyzed at the end of the treatment. Donor-specific anti-CD45.2 and recipient-specific anti-CD45.1 antibodies were used to discriminate donor-derived cells from recipient cells. For hematopoietic reconstitution assays, WT LSK cells from C57BL/6-Ly5.1 mice were cultured for 48 hr in the absence or presence

of BSO and/or CXCL12 in DMEM medium supplemented with 10% FBS, recombinant mSCF (100 ng/mL) and TPO (100 ng/mL), all from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). 3000 LSK cells per mouse were then injected into lethally irradiated C57BL/6J-Ly5.2 mice.

Flow cytometric sorting and analysis. Cell suspensions from mouse BM and spleen were collected and stained with allophycocyanin (APC)-conjugated rat anti-mouse lineage (Lin) antibodies, including anti CD3, B220, Gr-1, Ter119 and CD41 antibodies. For sorting of LSK cells, Lin⁻ cells were stained with phycoerythrin-Cyanine 7 (PE-Cy7) conjugated anti-Sca-1 and peridin chlorophyll protein-cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5) conjugated anti-c-Kit antibodies. For analysis of LSK-SLAM cells in BM, spleen and blood of CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras, cells were stained with Alexa Fluor 700 conjugated anti-CD45.2 antibody, APC-Cy7-conjugated anti-CD41, PE-Cy7 conjugated anti-Sca-1, PerCP-Cy5 conjugated anti-c-Kit, PE conjugated anti-CD150 and Pacific Blue conjugated anti-CD48 antibodies. In HSC proliferation assays *in vivo* (BrdU experiments), the same multi-marker subset was used, except that APC-conjugated antibody against CD48 was applied. All antibodies were either from BD Biosciences or Biolegend, San Diego, CA, USA. Hematopoietic populations were analyzed or sorted on FACS LSR II or FACSCanto II and on Influx cytometry (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA), respectively.

Microarray expression analysis. RNAs were extracted from sorted LSK cells from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeric mice, using the RNeasy Micro protocol (QIAGEN). cDNA labeling, hybridization and data analyses were performed using oligonucleotide microarrays (4 × 44 K mouse Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Data were extracted from scanned images using Feature Extraction software (Agilent) with default settings. Data from all hybridizations were analyzed with Rosetta Resolver software.

Assessment of p38 MAPK phosphorylation by flow cytometry. BM cells from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras were first submitted to immunofluorescent staining of cell surface antigens as described above to allow later gating on mature and immature cell populations. After fixation and permeabilization with BD Cytotfix/Cytoperm Buffer, cells were labeled with anti phospho-p38 MAPK rabbit antibody (Thr180/Tyr182) or rabbit specific IgG, followed by goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 antibodies. Positive staining was determined by analysis on FACSCanto II.

Intracellular and mitochondrial ROS detection. Intracellular ROS was monitored by flow cytometry using the redox-sensitive dye 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCF-DA). Cells were loaded with 2 μM DCFH₂-DA for 20 min at 37 °C. For detection of mitochondrial super oxide anion (O₂⁻) production, cells were loaded with 2 μM MitoSOX 30 min at 37 °C. To show specific mitochondrial ROS production, sorted LSK cells were incubated 20 min at 37 °C with 10 μM of the mitochondrial ROS scavenger MitoTempo before induction of mitochondrial ROS production.

Oxidative stress induction. BM cells from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras were cultured for 24 hr with BSO (10 μM) or vehicle (DMSO). Oxidative stress induction in LSK and LK cells was achieved with BSO (100 μM, 24 hr or 48 hr).

DNA double-strand breaks assay. LSK cells from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras or WT LSK cells were incubated with mouse anti-phospho-H2AX (Ser139) antibody followed by staining with ALEXA-546-conjugated anti-mouse antibody. Nuclei were stained with DAPI for microscopic examination. Cells were considered positive when they displayed more than four γH2AX foci per cell.

Statistical Analysis. Results given as mean ± standard SEM were analyzed with the two-tailed unpaired Student's t-test. Differences were considered significant when P-value was *p < 0.05; **p < 0.01 and ***p < 0.001. Additional methods are listed in Supplemental Procedures.

References

1. D'Au-tréaux, B. & Toledano, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 813–824 (2007).
2. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **24**, R453–R462 (2014).
3. Yahata, T. *et al.* Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* **118**, 2941–50 (2011).
4. Adam-Vizi, V. & Chinopoulos, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 639–45 (2006).
5. Rigoulet, M., Yoboue, E. D. & Devin, A. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H(2)O(2) signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 459–68 (2011).
6. Balaban, R. S., Nemoto, S. & Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483–95 (2005).
7. Gruber, J. *et al.* Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing. *Biotechnol. Adv.* **31**, 563–92 (2013).
8. Mendelson, A. & Frenette, P. S. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat. Med.* **20**, 833–846 (2014).
9. Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* **132**, 631–644 (2008).
10. Owusu-Ansah, E. & Banerjee, U. Reactive oxygen species prime Drosophila hematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* **461**, 537–541 (2009).
11. Tesio, M. *et al.* Enhanced c-Met activity promotes G-CSF-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells via ROS signaling. *Blood* **117**, 419–428 (2011).
12. Ito, K. *et al.* Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **12**, 446–451 (2006).
13. Herault, O. *et al.* A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells. *J. Exp. Med.* **209**, 895–901 (2012).

14. Yamashita, M., Nitta, E. & Suda, T. Aspp1 Preserves Hematopoietic Stem Cell Pool Integrity and Prevents Malignant Transformation. *Cell Stem Cell* **17**, 23–34 (2015).
15. Maryanovich, M. *et al.* An MTCH2 pathway repressing mitochondria metabolism regulates haematopoietic stem cell fate. *Nat. Commun.* **6**, 7901 (2015).
16. Miyamoto, K. *et al.* Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell Stem Cell* **1**, 101–112 (2007).
17. Liu, J. *et al.* Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature* **459**, 387–392 (2009).
18. Naka, K., Muraguchi, T., Hoshii, T. & Hirao, A. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1883–1894 (2008).
19. Wu, W.-S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 695–705 (2006).
20. Juntilla, M. M. *et al.* AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. *Blood* **115**, 4030–4038 (2010).
21. Morrison, S. J. & Spradling, A. C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* **132**, 598–611 (2008).
22. Bigarella, C. L., Liang, R. & Ghaffari, S. Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development* **141**, 4206–4218 (2014).
23. Ding, L. & Morrison, S. J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* **495**, 231–5 (2013).
24. Ma, Q. *et al.* Impaired B-lymphopoiesis, myeloopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9448–9453 (1998).
25. Nagasawa, T. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *J. Mol. Med. (Berl)*. **92**, 433–9 (2014).
26. Foudi, A. *et al.* Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4^{-/-} chimeric mice. *Blood* **107**, 2243–2251 (2006).
27. Peled, A. *et al.* The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest* **104**, 1199–1211 (1999).
28. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977–988 (2006).
29. Nie, Y., Han, Y.-C. & Zou, Y.-R. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J. Exp. Med.* **205**, 777–83 (2008).
30. Sanchez-Aguilera, A. *et al.* Estrogen signaling selectively induces apoptosis of hematopoietic progenitors and myeloid neoplasms without harming steady-state hematopoiesis. *Cell Stem Cell* **15**, 791–804 (2014).
31. Walter, D. *et al.* Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature* **520**, 549–52 (2015).
32. Bowie, M. B. *et al.* Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J. Clin. Invest.* **116**, 2808–16 (2006).
33. Maryanovich, M. *et al.* The ATM–BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **14**, 535–541 (2012).
34. Griffith, O. W. Depletion of glutathione by inhibition of biosynthesis. *Methods Enzymol.* **77**, 59–63 (1981).
35. Ito, K. *et al.* Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **431**, 997–1002 (2004).
36. Mantel, C. R. *et al.* Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock. *Cell* **161**, 1553–65 (2015).
37. Mantel, C., Messina-Graham, S. V. & Broxmeyer, H. E. Superoxide flashes, reactive oxygen species, and the mitochondrial permeability transition pore: potential implications for hematopoietic stem cell function. *Curr. Opin. Hematol.* **18**, 208–13 (2011).
38. Chen, C. *et al.* TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J. Exp. Med.* **205**, 2397–408 (2008).
39. Li, N. *et al.* Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.* **278**, 8516–8525 (2003).
40. Walter, D. *et al.* Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature* **520**, 549–52 (2015).
41. Sánchez-Aguilera, A. *et al.* Estrogen signaling selectively induces apoptosis of hematopoietic progenitors and myeloid neoplasms without harming steady-state hematopoiesis. *Cell Stem Cell* **15**, 791–804 (2014).
42. Yalcin, S. *et al.* Foxo3 is essential for the regulation of ataxia telangiectasia mutated and oxidative stress-mediated homeostasis of hematopoietic stem cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 25692–25705 (2008).
43. Espinosa-Diez, C. *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* **6**, 183–197 (2015).
44. Mantel, C., Messina-Graham, S. & Broxmeyer, H. E. Upregulation of nascent mitochondrial biogenesis in mouse hematopoietic stem cells parallels upregulation of CD34 and loss of pluripotency: a potential strategy for reducing oxidative risk in stem cells. *Cell Cycle* **9**, 2008–17 (2010).
45. Simsek, T. *et al.* The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **7**, 380–90 (2010).
46. Steidl, U., Kronenwett, R. & Haas, R. Differential gene expression underlying the functional distinctions of primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells from peripheral blood and bone marrow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **996**, 89–100 (2003).

Acknowledgements

Agence Nationale de la Recherche (ANR to FL), the Foundation de France to FL and DIM Stempole to FL supported this work. YZ and MD were supported by Cancerpole, IDF. We thank A. Betems for her technical assistance, P. Rameau and Y. Lecluse for cell sorting, O. Bawa for immunohistochemistry and P. Gonin and the staff of the animal facility of Gustave Roussy, Villejuif, France). We are grateful to I. Godin for her help in figure editing, C. Dupuy and T. Lapidot for helpful discussions.

Author Contributions

M.W., Y.Z., M.D., L.H., A.F., E.K., I.P., E.L. performed experiments and analyzed data. N.F. provided reagents. E.S. and W.V. critical read the manuscript. P.O., O.H. managed experiments and provided facilities. C.D., P.D., V.J. performed bioinformatic and computational analysis. M.W. and E.L. conceived the project, analyzed data and wrote the paper. All authors contributed to writing and editing.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Supplementary Information

CXCR4/CXCL12 axis counteracts hematopoietic stem cell exhaustion through selective protection against oxidative stress

Yanyan Zhang^{1,10}, Mallorie Dépond^{1,10}, Liang He¹, Adlen Foudi², Edward Owusu Kwarteng¹, Evelyne Lauret³, Isabelle Plo¹, Christophe Desterke⁴, Philippe Dessen⁵, Nobutaka Fujii⁶, Paule Opolon⁷, Olivier Herault^{8,9}, Eric Solary¹, William Vainchenker¹, Virginie Joulin¹, Fawzia Louache^{1,9,11*}, Monika Wittner^{1,9,11}

¹Paris-Saclay University, UMRS-1170, Gustave Roussy, Villejuif, France

²Paris-Saclay University, INSERM U935, Andre Lwoff Institute, Paul Brousse Hospital, Villejuif

³Paris Descartes University, CNRS (UMR 8104), Inserm U1016, Institut Cochin, Paris,

⁴Paris-Saclay University, UFR Medicine, INSERM UMS 33, Andre Lwoff Institute, Paul Brousse Hospital, Villejuif.

⁵Bioinformatic platform, UMS AMMICA, INSERM US23/CNRS UMS3665, Gustave Roussy, Villejuif

⁶Kyoto University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto, Japan

⁷Laboratoire de pathologie expérimentale, Gustave Roussy, Villejuif

⁸CNRS UMR 7292 GICC, Tours, France

⁹CNRS GDR 3697 MicroNiT

¹⁰These two authors contributed equally

¹¹Co-senior author

Supplemental procedures

Antibodies, hematopoietic reconstitution and flow cytometric analysis. The following antibodies were used: anti-phospho-p38 MAPK rabbit mAb (Thr180/Tyr182, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); mouse monoclonal anti-phospho-H2AX (Ser139) antibody (Upstate Biotechnology, Millipore); Alexa Fluor 488 F(ab)₂ fragment of goat anti-mouse IgG antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); APC-Cy7-anti-TER-119, B220, CD3e, GR-1, PerCP-Cy5.5-anti-c-Kit, PE-Cy7-anti-Sca-1, PE-anti-CD150, APC-anti-CD48 and Alexa Fluor 700-anti-CD45.2 (Biolegend, San Diego, CA, USA). For determination of chimerism, PE-anti-CD45.1 and APC-anti-CD45.2 were used (Biolegend, San Diego, CA, USA). Hematopoietic populations were analyzed on FACS LSRII or FACS CANTO II and sorted on Influx cytometers (BD Biosciences).

Chemicals. γ -glutamyl-cysteine-synthetase inhibitor buthionine sulfoximine (BSO), the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC), Rotenone and DAPI were purchased from Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA. p38 MAPK inhibitor SB203580 was obtained from TOCRIS Bioscience, Bristol, UK. The BrdU Flow KIT was purchased from BD Biosciences, CA, USA, the Annexin-V Assay kit from BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA. The fluorescent probes 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCF-DA), MitoSOX Red and MitoTempo were purchased from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. *CXCR4* inhibitor TN14033 (TN140) was previously described⁴⁷.

Histology. BM sections were fixed with formaldehyde, stained with hematoxylin/eosin/safran and examined by a Zeiss Axiophot microscope.

***In vitro* Colony-forming Cell assay.** Colony-forming cell (CFC) potential was assayed in semisolid methylcellulose medium (MethoCult M3234, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) supplemented with recombinant cytokines, as described previously²⁶. Colony-forming unit cells (CFU-C) were scored in duplicate seven days after plating.

Annexin-V Assay. Apoptosis was assayed by staining freshly harvested BM cells with lineage, stem and progenitor markers, followed by Annexin-V and DAPI staining according to the manufacturer's recommendations. Positive staining was determined by analysis on

FACS CANTOII (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA).

GSH/GSSG-Glo Assay. GSH/GSSG ratio was determined in sorted CD45.2⁺ donor-derived LSK and LK cells from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras, 8 weeks after transplantation of FL cells. The GSH/GSSG-Glo assay kit (Promega, Madison, WI, USA), a luminescence-based system for the detection and quantification of total glutathione (GSH+GSSG), GSSG and GSH/GSSG ratios was used, according to the manufacturer's recommendations.

Retroviral Transduction. Retroviral gene transduction of cDNAs encoding mouse CXCR4 was performed with the retroviral vector Migr/IRES/EGFP. Three months after transplantation, CD45.2⁺/Lin⁻ cells were sorted from CXCR4^{+/+} or CXCR4^{-/-} chimeras and incubated for 24 hr with 100 ng/mL SCF and 100 ng/mL thrombopoietin, followed by incubation for 48 hr with retrovirus. The efficiency of gene transduction was evaluated by expression of EGFP. Transduced cells were transplanted into lethally irradiated Ly5.1 mice.

Expression of antioxidative genes. Analyses were performed by real-time qRT-PCR on the LightCycler® 480 microwell plate-based cycler platform (Roche Applied Science) using Universal ProbeLibrary assays designed with the ProbeFinder software (Roche Applied Science). Three micrograms of total RNA from each sample were reverse transcribed using the SuperScript® VILOTM cDNA Synthesis kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Primers were purchased from Invitrogen and Universal ProbeLibrary probes from Roche Applied Science (nucleotide sequences of the primers and probes on request). All targets were concomitantly analyzed. Real-time qRT-PCR reactions were carried out in a total volume of 10 µL on 20 ng of cDNA using LightCycler® 480 Probes Master (Roche Applied Science). The LightCycler® 480 was programmed to an initial denaturation (95°C, 10 min) following by 45 cycles of 10 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, 1 sec at 72°C and a final cooling step at 40°C for 10 sec. All reactions were run in triplicate, and average values were used for quantification. The antioxidant gene expression was determined comparatively to the housekeeping genes (GAPDH, TBP, ACTB). The relative antioxidant gene expression was analyzed using the $2^{\text{exp}(-\Delta\Delta C(T))}$ method (Livak KJ and Schmittgen TD, Methods 2001;25:402-408).

HSC proliferation analysis. Two months after transplantation of FL cells, CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeric mice were injected with BrdU (1 mg BrdU/kg body weight, i.p.). After 18 hr, BM cells were recovered and stained with lineage, stem and progenitor markers and

permeabilized, followed by staining with FITC-conjugated anti-BrdU according to the manufacturer's recommendations.

In vivo inhibitor studies. *CXCR4* inhibitor TN14033 (TN140, 24 mg/kg/day) was administered by Alzet osmotic pumps for seven days (Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) as previously described⁴⁸. Control animals received pumps containing PBS.

Supplementary Figure S1

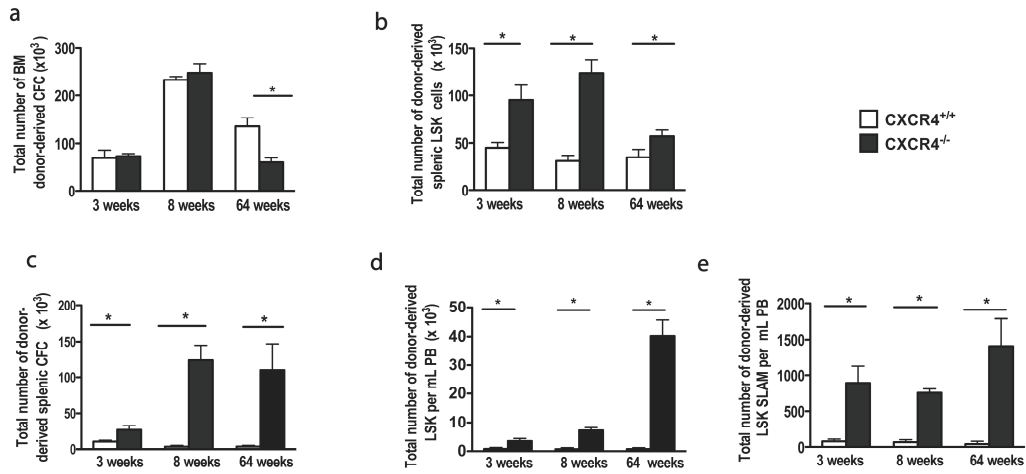
Progressive hematopoietic long-term deficit, increased extra medullary hematopoiesis and peripheral circulation of HSPCs in CXCR4^{-/-} chimeras. (a,b) Total numbers of donor-derived colonies (CFCs) formed from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} BM (2 femurs + 2 tibia) and spleen in colony-forming cell assay, evaluated 3 weeks, 8 weeks and 64 weeks after transplantation of CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} FL cells. BM and splenic CD45.2⁺ cells were sorted and plated in duplicate in semisolid medium under standard conditions (CXCR4^{+/+} cells) or in the presence of 600 µg/mL G418 (CXCR4^{-/-} cells). As CXCR4^{-/-} FL cells carry a neomycin insertion cassette, G418 allows to validate for the origin of CFCs. Data are represented as mean ± SEM of colonies from CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} BM, spleen and PB samples obtained from 4-7 mice per group in 2 independent experiments. **(c-e)** Total numbers of donor-derived CD45.2⁺ LSK (spleen, PB) and LSK-SLAM (PB) cells of CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras. LSK-SLAM and LSK cell numbers were determined by immuno phenotyping, considering cellularity and chimerism of the respective organs. Data are represented as mean ± SEM of total cell numbers obtained from 4-7 mice per group in 2 independent experiments.

Supplementary Figure S2

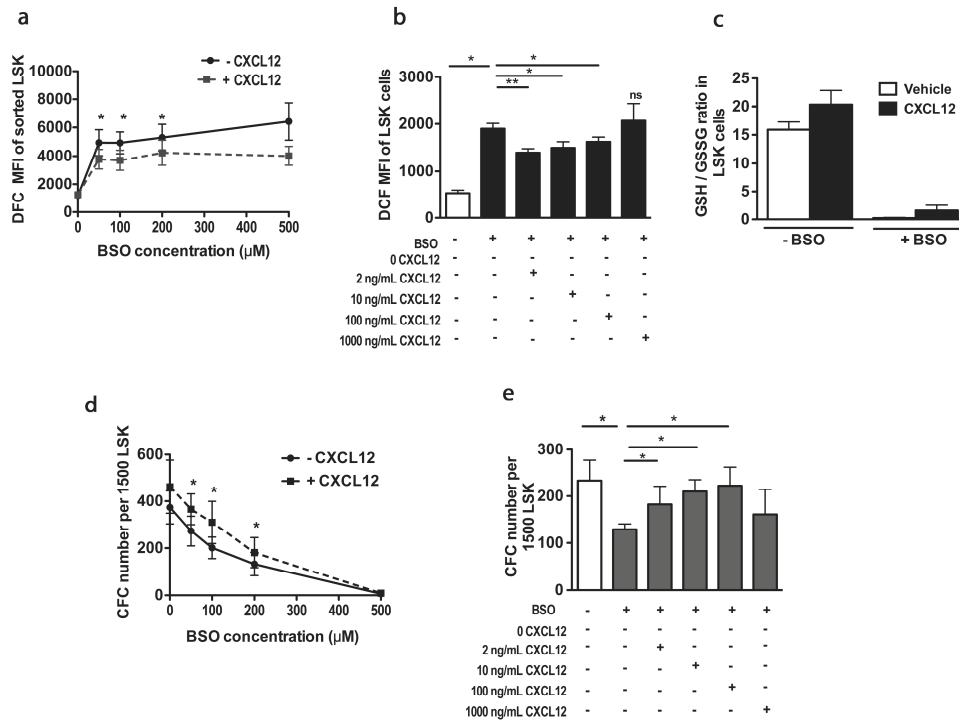
Increased ROS levels after BSO treatments abrogate colony-forming capacity of HSPCs: rescue effect of CXCL12. (a) BSO-treatment *in vitro* for 48 hours increased ROS levels in sorted WT LSK cells from ten-week-old mice in a dose-dependent manner. ROS levels were significantly decreased when 10 ng/mL CXCL12 was simultaneously added to the culture medium. Data are mean ± SEM of DCF MFIs obtained in 5 independent experiments. **(b)** Dose-dependent rescue effects of CXCL12 on BSO-induced ROS level increases in LSK cells. Data are mean ± SEM of DCF MFIs measured in 5 independent experiments. **(c)** Freshly isolated WT LSK cells were cultured for 48 hours in the absence or presence of BSO alone or with CXCL12. The GSH/GSSG ratio was determined with the GSH/GSSG-Glo Assay. Data represent mean ± SEM of GSH/GSSG ratios from 3 independent experiments, performed in triplicate. **(d)** Dose-dependent inhibition of progenitor growth of sorted LSK cells by BSO in the absence or presence of 10 ng/mL CXCL12. Cells were cultured for 48 hr in the presence of BSO or vehicle, washed and plated in semisolid medium in duplicate. Data represent mean ± SEM from colony numbers of 5 independent experiments. **(e)** Dose-dependent rescue effects of CXCL12 on BSO-induced inhibition of LSK CFC potential. Data represent mean ± SEM from colony numbers of 3 independent experiments.

Supplementary Figure S3

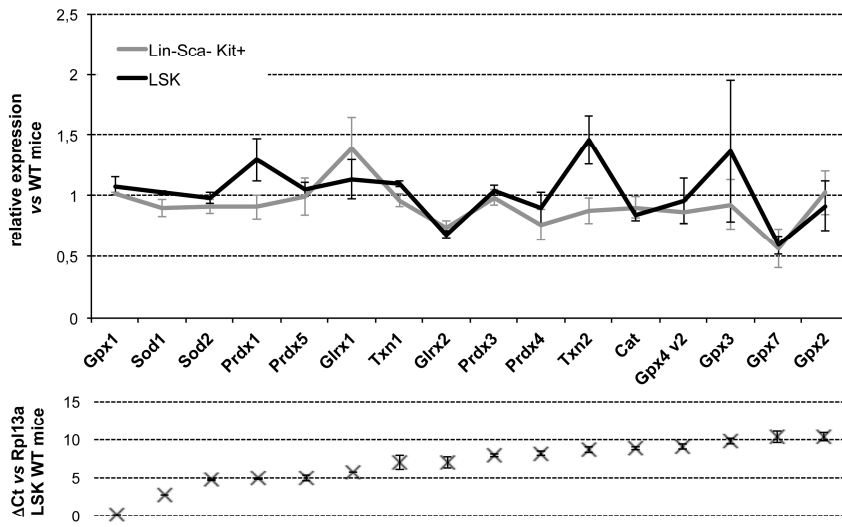
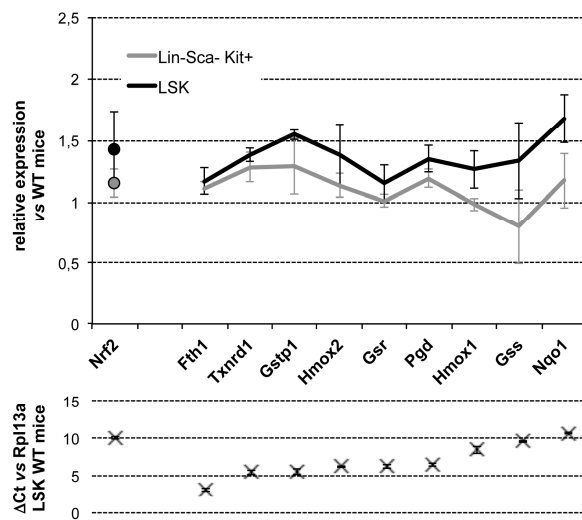
ROS-induced up regulation of antioxidant enzyme expression in HSPCs of ten-week-old CXCR4^{+/+} and CXCR4^{-/-} chimeras. (a) Results of qRT-PCR assays for expression of antioxidant enzymes performed on donor-derived sorted LK (grey line) and LSK cells (black line) are presented as CXCR4^{-/-} over CXCR4^{+/+} expression ratios (mean +/- SD, n=3). Delta Ct values (vs Rpl13a) shown below indicate expression level of each transcript in LSK cells (bottom). **(b)** Results of qRT-PCR assays for expression of nuclear targets of NRF2 performed on donor-derived sorted LK (grey line) and LSK cells (black line) are presented as CXCR4^{-/-} over CXCR4^{+/+} expression ratios (mean +/- SD, n=3). Delta Ct values (vs Rpl13a) shown below indicate expression level of each transcript in LSK cells (bottom).



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2

a**b**

Supplementary Figure 3

Article 2 : « Implication du facteur de transcription ASCL2 dans l'hématopoïèse normale et leucémique »

Comme pour tous les cancers, les LAM se caractérisent par l'altération de différentes voies affectant la prolifération cellulaire et la différenciation. Il est actuellement bien établi qu'elles sont liées à la présence de cellules souches leucémiques capables d'initier et de maintenir une croissance leucémique tout en étant bloquées dans le processus de différenciation. Des études récentes ont étendu ce modèle à d'autres types de cancers, y compris le cancer du sein, le glioblastome multiforme et le cancer colorectal. Tout comme les CSH normales, les CSL sont dépendantes du microenvironnement médullaire et de nombreuses études ont montré que leur rétention dans la moelle osseuse par le couple CXCR4/CXCL12 permet leur maintien et participe à leur chimiorésistance. Dans ce contexte CXCR4 a un rôle régulateur direct de la prolifération, de la survie ou du niveau des ROS comme c'est le cas dans les cellules normales. Ces fonctions sont médiées par l'activation de différentes voies de signalisation dont la PI3K/AKT, ERK et Jak/Stat. La voie CXCR4/CXCL12 peut également favoriser le maintien des cellules souches néoplasiques en activant des voies plus spécifiques des niches. Dans ce contexte, CXCL12 peut activer la voie Wnt connue pour son rôle essentiel dans l'auto-renouvellement de la plupart des cellules souches cancéreuses. Par ailleurs, de part sa capacité à maintenir les cellules dans la moelle, l'axe CXCR4/CXCL12 pourrait aussi exercer une fonction plus indirecte en maintenant les cellules à proximité des signaux de la niche dont les ligands Wnt.

Le facteur de transcription ASCL2 de la famille bHLH est un gène cible de voie Wnt. Il contrôle le devenir des cellules souches intestinales et en tant que cible Wnt, il est impliqué dans leur maintien en régulant leur identité. Sa surexpression induit une hyperplasie intestinale et sa déplétion entraîne l'appauvrissement en cellules souches intestinales. ASCL2 est également surexprimé dans les cellules T helper folliculaires où il régule l'expression du récepteur CXCR4. À l'inverse, la signalisation CXCR4 et Wnt régule l'expression d'ASCL2 suggérant que CXCR4 et ASCL2 interagissent pour réguler la formation de métastases. ASCL2 est devenu un

sujet d'intérêt majeur car il est surexprimé dans divers types de tumeurs (carcinome épidermoïde pulmonaire, cancer du sein, cancer gastrique et cancer colorectal) où il pourrait être utilisé comme marqueur prédictif du mauvais pronostic. ASCL2 est étroitement connecté à CXCR4 mais sa fonction dans l'hématopoïèse n'avait jamais été décrite avant le début de ma thèse. L'objectif de mon travail a été d'élucider le rôle d'ASCL2 dans l'hématopoïèse normale et leucémique. J'ai analysé son expression dans deux cohortes de LAM et dans différentes populations hématopoïétiques normales. Nos résultats indiquent qu'ASCL2 est surexprimé dans les LAM par rapport aux progéniteurs CD34 + sains et est un marqueur de mauvais pronostic.

Afin d'approcher sa fonction, j'ai entrepris deux approches. Dans la première approche, j'ai étudié l'effet de plusieurs shRNA dans un modèle de leucémie murine. Dans ce modèle, j'ai montré que l'inhibition d'ASCL2 entraîne un défaut de prolifération des cellules leucémiques et des progéniteurs leucémiques. De même, les shRNA diminuent le processus leucémique et augmentent la survie des animaux. Ensuite j'ai entrepris d'examiner l'effet de la surexpression d'ASCL2 dans des cellules primaires CD34+. L'expression de la forme sauvage et de la forme activée dans les progéniteurs humains induit un blocage de la différenciation et de la prolifération tandis que la forme transrépressive induit une augmentation de la prolifération des progéniteurs CD34+.

Nos résultats qu'ASCL2 est un régulateur important dans le développement des LAM et suggèrent que l'expression d'ASCL2 est associée à l'agressivité de la leucémie.

Article 2 : Implication du facteur de transcription ASCL2 dans l'hématopoïèse normale et leucémique

INVOLVEMENT OF THE TRANSCRIPTION FACTOR ASCL2 IN NORMAL AND LEUKEMIC HAEMATOPOIESIS

Article en cours de finalisation avant soumission

Mallorie Dépond^{1,7}, Yanyan Zhang¹, Liang He¹, Viviane Baral¹, Monika Wittner¹, Ruoping Tang², Ollivier Legrand³, Marie-Christine Béné⁴, François Delhommeau³, Virginie Joulin¹, Olivier Albagli⁵, Fawzia Louache^{1,6}

¹UMR1170, Gustave Roussy, Villejuif ;

²Tumorothèque leucémies et syndromes myéloprolifératifs, Hôpital Saint-Antoine, Paris;

³Service d'hématologie et de thérapie cellulaire, Hôpital Saint-Antoine, Paris;

⁴Laboratoire d'hématologie biologique, CHU de Nantes, Nantes;

⁵Équipe contrôle du pancréas endocrine, Institut Cochin, Paris

⁶CNRS GDR 3697 MicroNiT

⁷Université Sorbonne Paris Cité, Paris Diderot, Paris ;

Abstract

The transcription factor ASCL2 (Achaete Scute-like 2) plays an important role in embryonic development and regulates the proliferation and differentiation of intestinal stem cells in the adult. In addition, it is over-expressed in numerous tumor types. However, we are the first to investigate in the field of ASCL2 contribution to AML. We have found that ASCL2 is expressed in leukemic cells of 30% of patients with acute myeloid leukemia (AML) but not in hematopoietic stem and progenitor cells derived from normal individuals. In MLL-ENL transduced fetal liver cells, to generate a murine leukemic model, stable knockdown of ASCL2 expression by RNA interference inhibited the proliferation of cells and strongly reduced both their *in vitro* clonogenic potential and their *in vivo* leukemic potential. Conversely, overexpression of ASCL2 inhibits the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitors and impacted the differentiation of leukemic cell lines. Interestingly, while a constitutively trans-activating derivative of ASCL2 (ASCL2-VP16) has inhibitory effect on proliferation, the constitutively trans-repressing derivative of ASCL2 (ASCL2-Krab) induces an expansion of CD34⁺ cells. These results demonstrate that aberrant expression of the developmental regulatory gene ASCL2 in the adult hematopoietic compartment is a frequent event in the pathogenesis of AML and suggest a role for ASCL2 overexpression as part of an effector pathway that contributes to AML development by inhibition of terminal differentiation. Moreover, our data suggest that ASCL2 overexpression contributes to AML development by inhibiting terminal differentiation merely through gene repression.

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous human disease defined by an accumulation of immature myeloblasts in the bone marrow and peripheral blood. Like other cancers, AML is a multi-step process characterized by the alteration of different pathways affecting cell proliferation and myeloid differentiation. Over the last few years, it has been recognized that AML is maintained by leukemic stem cells (LSCs), which are capable of initiating and sustaining leukemic growth (Bonnet and Dick, 1997). These cells drive the growth and dissemination of the leukemia as demonstrated by serial transplantation experiments. Recent studies have extended this model to other types of cancers including breast cancer, glioblastoma multiform and colorectal cancer. The canonical Wnt/b-catenin pathway has a critical role in self-renewal of most cancer stem cells (Nusse and Clevers, 2017). There is evidence that Wnt expression can inhibit the differentiation of HSCs, whereas overexpression of Axin (an antagonist of b-catenin activation) has an inhibitory effect on Wnt signaling, which in turn results in a decrease in HSCs number. Moreover, the addition of purified Wnt3a ligand in *ex vivo* culture has been used successfully to expand HSCs.

The transcription factor ASCL2 (Achaete Scute-like 2), from the well-conserved bHLH (basic helix-loop-helix) family is a newly described Wnt target gene and controls the fate of Lgr5⁺ intestinal stem cells (van der Flier *et al.*, 2009; Schuijers *et al.*, 2015). Besides intestinal tissues, ASCL2 is predominantly detected in extra embryonic tissues where it controls the placenta development (Guillemot *et al.*, 1994). As a Wnt target, in adult intestinal tissues, it is involved in intestinal stem cell biology contributing to their stem cell identity and stimulating their proliferation (van der Flier *et al.*, 2009). In both intestinal cancer cells and T follicular cells, ASCL2 regulates the expression of CXCR4, a chemokine receptor involved in cell migration, homing and proliferation. Conversely, CXCR4 and Wnt signaling regulates ASCL2 expression suggesting that CXCR4 and ASCL2 interact to regulate the normal and possibly pathologic (e.g. metastatic) cell migration (Kury *et al.*, 2002; Dessein *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). Moreover, ASCL2 has become a focus of interest because it is over-expressed in diverse tumor types (lung squamous cell carcinoma, breast cancer, gastric cancer and colorectal cancer) where it could be used as a predictive marker of the poor prognosis (de Sousa E Melo *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2013; Conway *et al.*, 2014; Wentzensen *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015). Interestingly, in muscle cells, ASCL2 has been recently described as a negative regulator of differentiation by titration of E-proteins and acting like an E-box binding

competitor. Thus, at least in this cellular context, ASCL2 might prevent differentiation by antagonizing the transactivation mediated by E box-binding transcription factors (Wang *et al.*, 2017).

The aim of this study is to elucidate the role of ASCL2 in normal and pathologic hematopoiesis. To this end, we analyzed its expression in normal hematopoietic progenitors, in AML. Our results indicate that ASCL2 is overexpressed in AML compared to healthy CD34⁺ progenitors and a marker of poor prognosis. We transduced ASCL2-wt in normal hematopoietic progenitors, in AML and cell line models to study the impact of its overexpression. The expression of a « purely » transrepressive derivative of ASCL2 (ASCL2-KRAB) in human progenitors induces the proliferation/maintenance of CD34⁺ cells whereas, conversely, a « purely » transactivating form (ASCL2-VP16) dramatically inhibits proliferation of CD34⁺ progenitors. In AML murine models, ASCL2 down regulation delayed leukemic progression. Altogether, our results implicate ASCL2 as an important regulator in AML development and suggest that ASCL2 expression is associated with aggressiveness of leukemia. Our results further suggest that the oncogenic effects of ASCL2 rely merely on its transrepressive activity.

Results

1- Human hematopoietic cells express ASCL2 and high ASCL2 expression is correlated with poor prognosis AML.

The expression of ASCL2 has been demonstrated in intestinal, T follicular lymphocytes and placental cells. High expression was also found in tumor tissues including colorectal cancer, osteosarcoma, lung squamous cell carcinoma and breast cancer. To determine the ASCL2 expression in AML, we used samples of a first cohort of 49 patients to isolate PBMC containing at least 60% of CD34+ AML blasts (figure 1A). 32% of AML samples displayed a higher ASCL2 mRNA expression than normal progenitor CD34+ cells isolated from bone marrow of control individuals. The ASCL2 mRNA level in AML cells was higher than that observed in the primary colorectal cancer cell line SW480 and was close to that observed in its metastatic derivative SW620 cell line. As an important heterogeneity between samples was observed, we wonder whether this could be correlated to any clinical pathological data of patients. We thus used a second cohort that comprises 75 ARN samples of AML for which a complete follow-up was available and divided in three sub-groups depending of the prognosis. Strikingly, a high ASCL2 expression is correlated with a poor prognosis and age of patients ($p < 0,001$) suggesting that the heterogeneity that can be explained by the molecular prognosis of the patients. Of note, none of the following cell lines express ASCL2: HEL, HL60, Jurkat, K562, MO7E, THP1, U937, UT7, CEM and Kasumi. However, ASCL2 was expressed in Monomac-1 and Molm-14 cell lines (data not shown). As these two cell lines are characterized by MLL gene alterations, we also investigated the ASCL2 expression profile in a new cohort of 17 AML samples carrying a MLL rearrangement with poor prognosis of AML. We also found a high mean of ASCL2 expression that was in the range of what was observed in the entire cohort suggesting that the heterogeneity of ASCL2 expression in AML is not specifically associated to MLL alterations but rather to the poor prognosis of the sample. Finally, we were not able to correlate ASCL2 expression with FAB class, based on the type of cell from which the leukemia develops and how mature the cells are (figure 1B).

To evaluate the ASCL2 expression in hematopoietic subpopulations, mononuclear cells from donor peripheral blood were used to sort mature lymphocytic, erythroid, megakaryocytic natural killer (NK) or monocytic subpopulations based on their surface markers. Lymphocytes, NK and monocytic cells express ASCL2 mRNA and erythroid

cells and megakaryocytes do not express it at all (figure 1C). Thus, these results indicate that ASCL2 expression in hematopoietic cells is normally restricted to certain subpopulations. Similarly to what has been observed in intestinal cells (Liu *et al.*, 2014), the ASCL2 mRNA expression is increased by a 48h treatment with the Wnt agonist TWS119 at 1micromolar in cord blood CD34+ cells (figure 1D). Taken together, these results indicate that ASCL2 transcripts are aberrantly expressed in about 30% of patients with AML and this expression correlates with disease prognosis.

2- ASCL2 inhibition delayed leukemic progression in vitro and in vivo in mice.

Mice transplanted with retroviral-mediated expression of MLL-ENL in primary murine myeloid progenitors develop AML (Lavau *et al.*, 2000; Somerville and Cleary, 2006; Liedtke and Cleary, 2009). To investigate the role of ASCL2 in AML, we first set up a murine model of AML by transducing isolated lineage negative cells from fetal liver mice with a retrovirus expressing MLL-ENL (figure 2A). Transduced leukemic blasts generate myelomonocytic leukemia within 2 to 3 months able to spread in hematopoietic organs (figures 2B, 2C). We then compared ASCL2 expression in these murine myeloid leukemic blasts to normal murine hematopoietic cells. As shown in figure 2D, MLL-ENL expressing blasts exhibited a higher ASCL2 mRNA expression compared to normal GMP progenitors. In line with the results obtained in human cells, we also observed ASCL2 expression in myeloid progenitors identified by KIT expression within the lineage negative population and also in SLAM cells. To assess the functional significance of aberrant ASCL2 expression in myeloid leukemias, MLL-ENL leukemic cells were transduced with short hairpin RNA (shRNA) targeting ASCL2. As shown in figure 2E, the shRNA1 and shRNA2 exhibited the most potent effect (86-65% mRNA knockdown), followed by shRNA3 (15%) as compared with the non-silencing control construct. We then investigated the effect of ASCL2 silencing on cell proliferation *in vitro*. Strikingly, the deletion of ASCL2 led to a strong growth inhibition in liquid culture (figure 2F). We next tested the ability of MLL-ENL cells transduced with the shRNA to form colonies in clonogenic methylcellulose assay. We observed a significant reduction in the number of colonies (figure 2G) after mRNA knockdown as compared with cells transduced with the non-silencing control construct. Having established that the ASCL2 expression is required for the growth of leukemic progenitors *in vitro*, we tested whether this protein is also required for MLL-ENL

expressing leukemia *in vivo*. FACS analyses of blood cells showed that knocking-down ASCL2 induces a sharp decrease in the number of leukemic cells in the mouse blood (figure 2H). We transplanted MLL-ENL cells transduced with the shRNA into sublethally irradiated recipient mice. The deletion of ASCL2 resulted in a substantial extension of lifespan of the mice ($p=0.0009$) (figure 2I). Altogether, these results suggest that aberrant expression of ASCL2 is required for the leukemogenicity of MLL-ENL expressing cells.

3- ASCL2 impairs the hematopoietic differentiation.

Previous studies have shown that overexpression of ASCL2 causes hyperplasia in the intestinal compartment and promoted osteosarcoma proliferation (van der Flier *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016). To investigate the role of ASCL2 in hematopoiesis, we first examined the effect of its enforced expression through lentiviral transduction on human hematopoietic progenitors using myeloid colony assays (figure 3A). Three days after incubation with lentivirus, between 60 and 98 % of sorted CD34⁺ cells had GFP signal in both ASCL2 and control groups reflecting a similar transduction efficiency (supplemental figure 1). Transduced cells (GFP⁺) were sorted and plated into methylcellulose cultures supporting myeloid differentiation. After 2 weeks, colonies were scored. In the presence of the cytokine cocktail SCF, IL-6, IL-3, and Epo, a sharp decrease in erythroid burst forming unit (BFU-E) was observed for ASCL2-transduced cells (figure 3B). The granulocyte monocyte colony-forming units (CFU-GM) formation was also decreased for ASCL2-transduced cells and was characterized by the presence of smaller and dispersed colonies more related to monocytic colonies (figure 3B, photos). These effects of ASCL2 on hematopoietic differentiation were most clearly observed in liquid cultures supplemented with specific cytokines favoring erythroid (SCF and Epo), megakaryocytic (TPO and SCF) or granulocytic (SCF, G-CSF and GM-CSF) cell growth. Indeed as illustrated in figures 3C and 3D, erythroid marked by GPA expression expanded rapidly in control cultures but not in ASCL2-transduced cells. Similarly, the megakaryocytic cell growth marked by CD41 expression was strongly reduced in ASCL2 cultures. There was also a reduction in the absolute numbers of CD15 expressing cells and monocytic cells expressing the CD14 antigen in ASCL2-transduced cells. However, the CD14⁺ cells percentage was higher in ASCL2 cultures compared to control cultures suggesting that monocytic differentiation was less

impacted compared to granulocytic, erythroid and megakaryocytic differentiation. Taken together, these results are consistent with the hypothesis that ASCL2 expression inhibits the production of mature cells and can skew their differentiation.

4- ASCL2 overexpression impairs the differentiation without altering the proliferation of leukemic cells.

Surprisingly, although aberrant upregulation of ASCL2 was found in 30% of AML cases, its overexpression in normal hematopoietic progenitors resulted in a sharp decrease in proliferation still associated with aberrant differentiation. Thus, we hypothesized that the oncogenic events present in leukemic cells could overcome the effects of ASCL2 overexpression on proliferation. To test this possibility, we performed overexpression experiments in HL-60 and U937, two leukemic cell lines that do not express ASCL2. To follow the fate of cells acutely transduced with ASCL2 over time, all cells exposed to the lentiviral vector were cultured, and the proportion of GFP⁺ cells was monitored by flow cytometry for 15 days. As shown in figure 4A, the GFP⁺ fraction of HL-60 cells remained stable over time in cells transduced with either ASCL2 lentivirus or control virus indicating that that enforced ASCL2 expression has no toxic effects in HL60. A similar effect was seen in U937 cells (figure 4C). In both cell lines, we observed decreased expression of CD14, CD15 and CD11b antigens in cultures transduced with ASCL2 construct (figures 4B and 4D). Taken together, these results indicate that aberrant expression of ASCL2 contributes to the abnormal differentiation of myeloid cells and suggest that ASCL2 overexpression has differential effect depending on the cell context.

5- The ASCL2-VP16 activating and ASCL2-Krab repressing forms have opposite effects on in vitro expansion of the CD34⁺ subset.

To understand whether the biological effects of ASCL2 rely on transcriptional activation, transcriptional repression, or both, we fused ASCL2 to previously characterized activating or repressing domains, including the activator domain of VP16 and the Krüppel-associated box repressor domain (Krab) of human Kox1 protein as depicted in figure 5A (Margolin *et al.*, 1994; Littlewood *et al.*, 1995; Albagli-Curiel *et al.*, 2007). To verify the efficacy of the VP16 and Krab-fusion proteins, we cloned 3 copies of the E-Box domain CAGGTG recognized by ASCL2 in pGL3 basic plasmid

coding for firefly luciferase (E-Box Luc). SW620 cell line was transduced by the either ASCL2-WT, ASCL2-VP16 or ASCL2-Krab lentivirus and sorted on GFP (figure 5B). The ASCL2 protein expression was confirmed by western blot experiment (figure 5C). Cells were then transfected with E-Box-Luc and pCMV renilla luciferase to monitor transfection efficiency. As expected, ASCL2-VP16 fusion is a very potent activator of transcription (15 fold) compared to ASCL2-WT (2,5 fold induction of transcription) (figure 5D). It remains to determine whether ASCL2-Krab is an inhibiting form of ASCL2. Thus, ASCL2-VP12 is a hypermorphie form of ASCL2, exaggerating the likely positive transcriptional effects of ASCL2.

We next tested the effects of fusion proteins within the context of human hematopoietic progenitor cells. After transduction of CD34⁺ cells with the different ASCL2 constructs, GFP positive cells were sorted and plated into methylcellulose cultures. After 2 weeks, colonies were scored (figure 5E). As observed for ASCL2-WT, the activated form of ASCL2 induced a sharp decrease in erythroid burst forming unit (BFU-E). The granulocyte monocyte colony-forming units (CFU-GM) formation was also decreased. This effect on erythroid colony was also evident with ASCL2-Krab protein. Surprisingly, whereas, ASCL2-VP16 reduced also the number of myeloid colonies, ASCL2-Krab expression was associated with the presence of highly proliferative and dense colonies (figure 5F). The effects of ASCL2 fusion proteins on hematopoietic differentiation were also investigated in liquid cultures as above. Erythroid, megakaryocytic and myelomonocytic cell numbers were strongly reduced in ASCL2-VP16 cultures (figures 6A, 6B). The repressive form ASCL2-Krab also inhibits hematopoietic proliferation but induce a skewing of differentiation depending of the culture conditions. It induces a strong decrease of erythroid, megakaryocytic and monocytic differentiation but not granulocytic subpopulation (figure 6B). Strikingly, whatever the culture conditions, ASCL2-Krab overexpression but not ASCL2 WT nor ASCL2-VP16 resulted in a sharp expansion of CD34⁺ subset cells (figures 6C, 6D).

Taken together, these results are consistent with the hypothesis that ASCL2 expression inhibits the production of mature cells.

Discussion

There are no data on the expression and function of ASCL2 in normal and malignant hematopoiesis. In this work, we provide the first demonstration that ASCL2 is expressed in subsets of normal hematopoiesis and is even more expressed in a group of AML with a poor prognosis. ASCL2 is poorly expressed in mature hematopoietic cells and progenitors, with the exception of NK cells and monocytes. 32% of the LAM has at least twice as much ASCL2 expression as normal CD34+ progenitors from healthy donor marrow. It remains to determine the mechanism underlying the highest expression of ASCL2 in AML. It has been reported that ASCL2 is a target of the Wnt pathway and we have confirmed that umbilical cord CD34 + cells treated with Wnt agonist TWS119 have increased ASCL2 expression. Thus, it is possible that LAM characterized by a high level of ASCL2 expression display deregulations of the Wnt pathway. It is also possible that deregulation of the methylation of the ASCL2 gene is at the origin of the observed changes in its expression. Indeed, it has been reported that modification in the methylation of the ASCL2 promoter is associated with an unfavorable prognosis. Surprisingly, ASCL2 promoter is hypermethylated in endometrial carcinomas and in a subtype of luminal breast cancers compared to the corresponding healthy tissues but still correlated to poor prognosis (Conway *et al.*, 2014; Wentzensen *et al.*, 2014).

In order to determine the role of ASCL2 in leukemic development, we first developed a murine model of AML in which ASCL2 could be detected. Of note, we demonstrated that expression of MLL-ENL in murine hematopoietic progenitor cells is associated with increased expression of ASCL2 mice. This is in line with the results obtained in human primary AML. It is important to note that MLL translocated leukemia are characterized by an aberrant Wnt signaling which can be involved in the up regulation of ASCL2 expression.

To directly assess the functional significance of aberrant ASCL2 expression in myeloid leukemias, we used an short hairpin RNA (shRNA) strategy which showed that ASCL2 down regulation is associated with a rapid cell death *in vitro* indicating that ASCL2 expression is required for the growth of leukemic progenitors *in vitro*. We also showed that knocking-down ASCL2 induces a sharp decrease in the number of leukemic cells in the mouse blood supporting the hypothesis that ASCL2 is in part

responsible for the increased proliferative and clonogenic capacity characteristic of AML. Further experiments are needed to identify the precise pathway involved.

Ectopic expression of ASCL2 in the intestinal compartment causes hyperplasia and ASCL2 overexpression promoted the proliferation of osteosarcoma cells. To examine the effect of ASCL2 ectopic expression in human hematopoietic progenitors, we cultured transduced cells in cytokines that stimulate cell growth. However, the treatment of hematopoietic progenitors with cytokines is inexorably associated with their exhaustion. We observed that ectopic expression of ASCL2 is associated with a sharp decrease in colony formation, which indicates an important effect of ASCL2 on cell proliferation. These effects of ASCL2 on hematopoietic differentiation were most clearly observed in liquid cultures supplemented with specific cytokines favoring erythroid (SCF and Epo), megakaryocytic (TPO and SCF) or granulocytic (SCF, G-CSF and GM-CSF) cell growth. Taken together, these results are consistent with the hypothesis that ASCL2 expression inhibits the production of mature cells. Further experiments are needed to distinguish between effects on cell proliferation and cell death. In addition, it will be important to perform additional experiments to overcome the confounding effect of ASCL2 on proliferation to clarify its effects on differentiation. Therefore, overexpression of ASCL2 should be studied in already differentiating cells. However, the effects of ASCL2 overexpression could be related to a simple toxic effect resulting in suppression of any kind of differentiation. It will be interesting to study the effect of ASCL2 using vectors that direct a low (PGK controlled) expression of the transgene.

We have demonstrated that ASCL2 display an activating activity on colony formation using fusion proteins with protein domains already known to have repressive or activating functions. This strategy has been already used to characterize the activity of several transcription factors. In the context of CD34⁺ cells, we observed that the transactivating form of ASCL2 (ASCL2 VP16) could be antiproliferative. However, our experiments indicate that transrepressing form of ASCL2 is able to amplify the CD34⁺ compartment even in presence of cytokines that induce differentiation. This raises the possibility that ASCL2 might contribute to CD34 maintenance/expansion through gene repression rather than gene activation. Previous studies have shown that some transcription factor of the same family as ASCL2 may act as transrepressive factor of differentiation as Tal1. Further experiments are needed to test this hypothesis.

Legends to Figures

Figure 1: Human hematopoietic cells express ASCL2 and high ASCL2 expression is correlated with poor prognosis AML.

(A) qRT-PCR analysis of ASCL2 mRNA expression in SW620 cell line, CD34⁺ progenitors for bone marrow of healthy donors, first cohort of 49 AML patients, second cohort of 75 AML patients divided in three groups of 25 samples depending on their good, intermediate and poor prognosis and 17 MLL-mutated AML. (B) qRT-PCR analysis of ASCL2 mRNA expression of the second cohort depending of the FAB class of AML, based on the type of cell from which the leukemia develops and how mature the cells are. (C) qRT-PCR analysis of ASCL2 mRNA expression of SW480, SW620 cell lines, mononuclear cells from donor peripheral blood sorted on their surface markers. (D) Cord blood CD34⁺ were treated with Wnt agonist TWS119 for 48h and assessed for ASCL2 mRNA expression.

Figure 2: ASCL2 inhibition delayed leukemic progression in vitro and in vivo in mice.

(A) Experimental design for evaluation of shRNA efficacy on leukemic development. Isolated lineage negative cells from fetal liver mice were transduced with a retrovirus expressing MLL-ENL and injected to sublethally irradiated mice. After leukemia establishment, leukemic blasts that developed in bone marrow were recovered and transduced with short hairpin RNA (shRNA) targeting ASCL2 and injected to sublethally irradiated mice. (B) Mice died from leukemia within 2 to 3 months. (C) After leukemia establishment (within 2 months), MGG coloration confirms the leukemic development. (D) qRT-PCR analysis of ASCL2 mRNA expression in murine hematopoietic subpopulations sorted by FACS and in MLL-ENL blast cells. (E) qRT-PCR analysis of ASCL2 mRNA expression in leukemic blast transduced by ASCL2 targeting shRNA and selected by puromycin during 48h. (F) Absolute number of leukemic blasts transduced with ASCL2 shRNA. After puromycin selection, cells were seeded in liquid culture for 5 days in presence of IL3 and SCF. (G) CFU assays in methylcellulose of leukemic blasts transduced with ASCL2 targeting shRNA and selected by puromycin. (H) Absolute number of leukemic cells discriminated on CD45.2 and GFP expression in the blood of mice sublethally irradiated, 8 weeks after engraftment with 2×10^5 leukemic blasts. (I) Improved survival of mice engrafted with leukemic blasts transduced with ASCL2 shRNA.

Figure 3: ASCL2 impairs the hematopoietic differentiation.

(A) pTrip background lentiviral vector for ASCL2 overexpression within MND viral promoter and control vector with luciferase as control. (B) After transduction by pTrip ASCL2 or control vectors, CD34⁺ were sorted on GFP expression and seeded for colony assays in methylcellulose. Absolute numbers of colonies were discriminated for erythroid lineage or myeloid lineage after 2 weeks culture. (C) After transduction and GFP sorting by flow, CD34⁺ cells were cultured in presence of specific cytokines favoring erythroid (SCF and Epo), megakaryocytic (TPO and SCF) or granulocytic (SCF, G-CSF and GM-CSF) cell growth. Percentages of the different hematopoietic subpopulations obtained after 5 days of *in vitro* culture. (D) Absolute numbers of each cell population determined by FACS over time (Day 5, 8, 12).

Figure 4: ASCL2 does not impair the proliferation of leukemic cell lines but alter their differentiation.

After transduction by pTrip ASCL2 or control vectors, CD34⁺, HL-60 cells (A, B) and U937 (C, D), the percentage of GFP expression was monitored over time. (B, D) Cells were analyzed by flow cytometry for differentiation markers.

Figure 5: The ASCL2-VP16 activating and ASCL2-Krab repressing forms have opposite effects on in vitro colony formation by CD34⁺ cells.

(A) pTrip background lentiviral vector for ASCL2-VP16 (transactivating form) and ASCL2-Krab (transrepressive form) overexpression within MND viral promoter. (B) Schematic representation of the strategy used to validate ASCL2VP16 and ASCL2-Krab constructs by dual bioluminescence assay in transduced SW620 cell line. (C) Western-blot of SW620 verifying the overexpression of the different constructs generated to express ASCL2 using a monoclonal anti-ASCL2 or a monoclonal anti-Flag in two dependent experiments. (D) Quantification of luminescence of Firefly normalized by luminescence of Renilla to evaluate the transcriptional activating potential of the different constructs on CAGGTG E-Box domain in SW620 cell line. (E) After transduction by pTrip ASCL2 fusion forms or control vectors, CD34⁺ were sorted on GFP expression and seeded for colony assays in methylcellulose. Absolute numbers of colonies were discriminated for erythroid lineage or myeloid lineage after 2 weeks culture. (F) Magnification x10 photon microscopy of myeloid colonies for control condition and ASCL2-Krab overexpression cells.

Figure 6: The ASCL2-VP16 activating and ASCL2-Krab repressing forms inhibit the in vitro proliferation and differentiation of the CD34⁺ but induce opposite skewing of differentiation.

(A) Absolute numbers of erythroid (GPA⁺), megakaryocytic (CD41⁺), granulocytic (CD15⁺) and monocytic (CD14⁺) subpopulations counted by FACS over time (Day 5, 8, 12). After transduction and GFP sorting by flow cytometry, CD34⁺ cells were cultured in presence of specific cytokines favoring erythroid (SCF and EPO), megakaryocytic (TPO and SCF) or granulocytic (SCF, G-CSF and GM-CSF) cell growth. (B) Percentages of each cell population determined by FACS over time (Day 5, 8, 12). (C) Percentages of CD34⁺ cells obtained after 5 days of *in vitro* culture in different cytokines conditions. (D) Absolute numbers of CD34⁺ cell counted by FACS over time (Day 5, 8, 12) in different cytokine conditions.

Figure 1

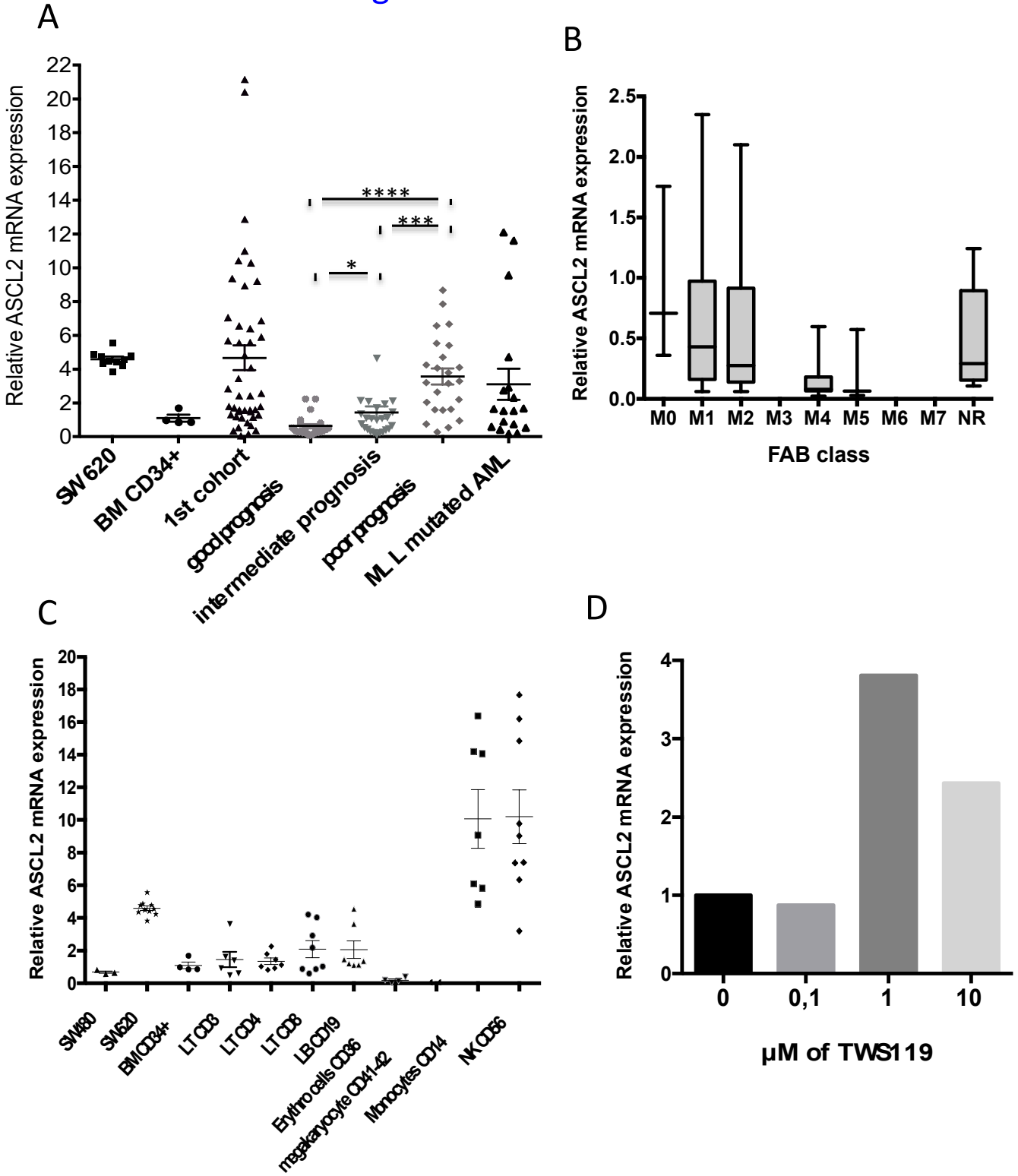


Figure 2

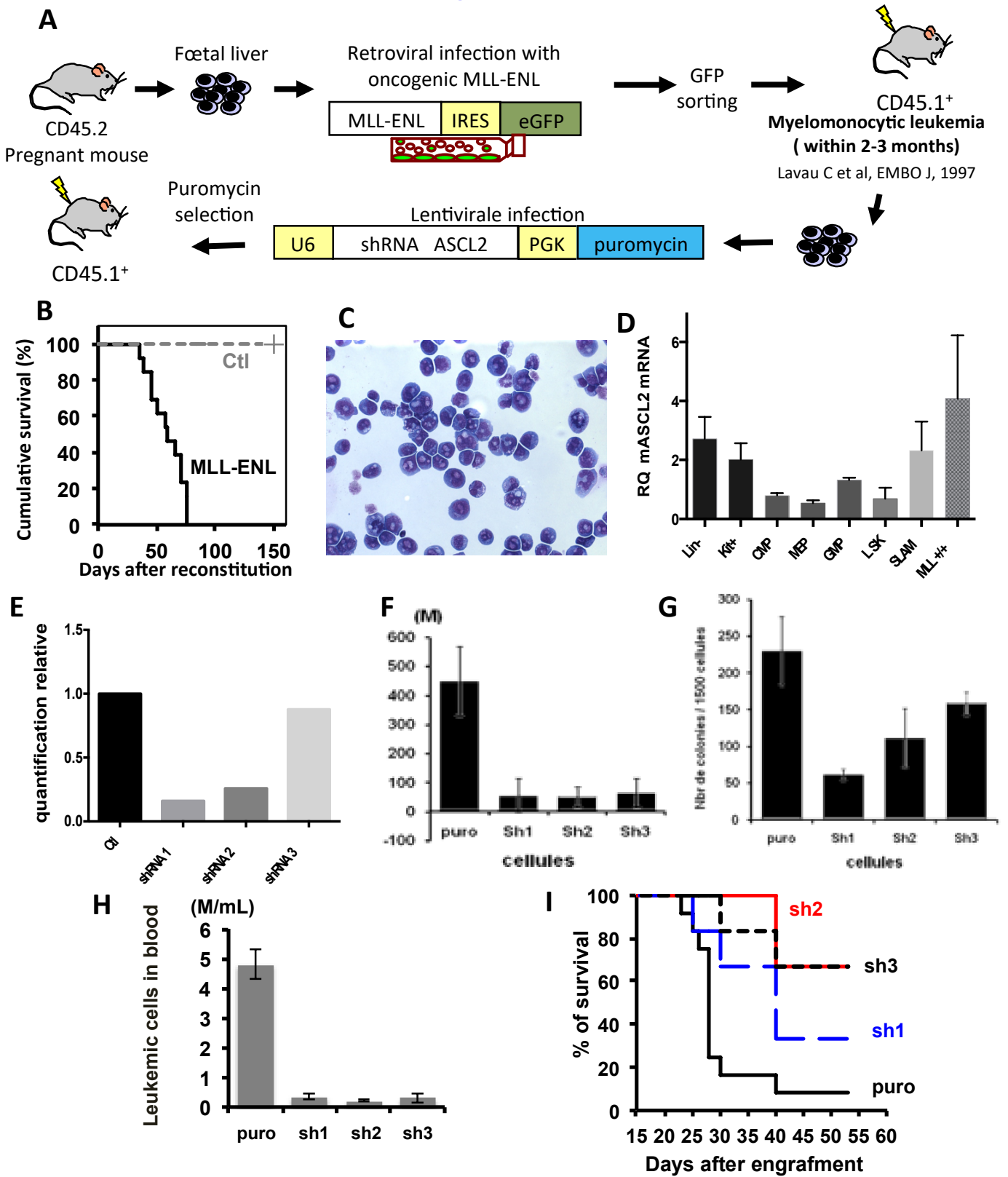


Figure 3

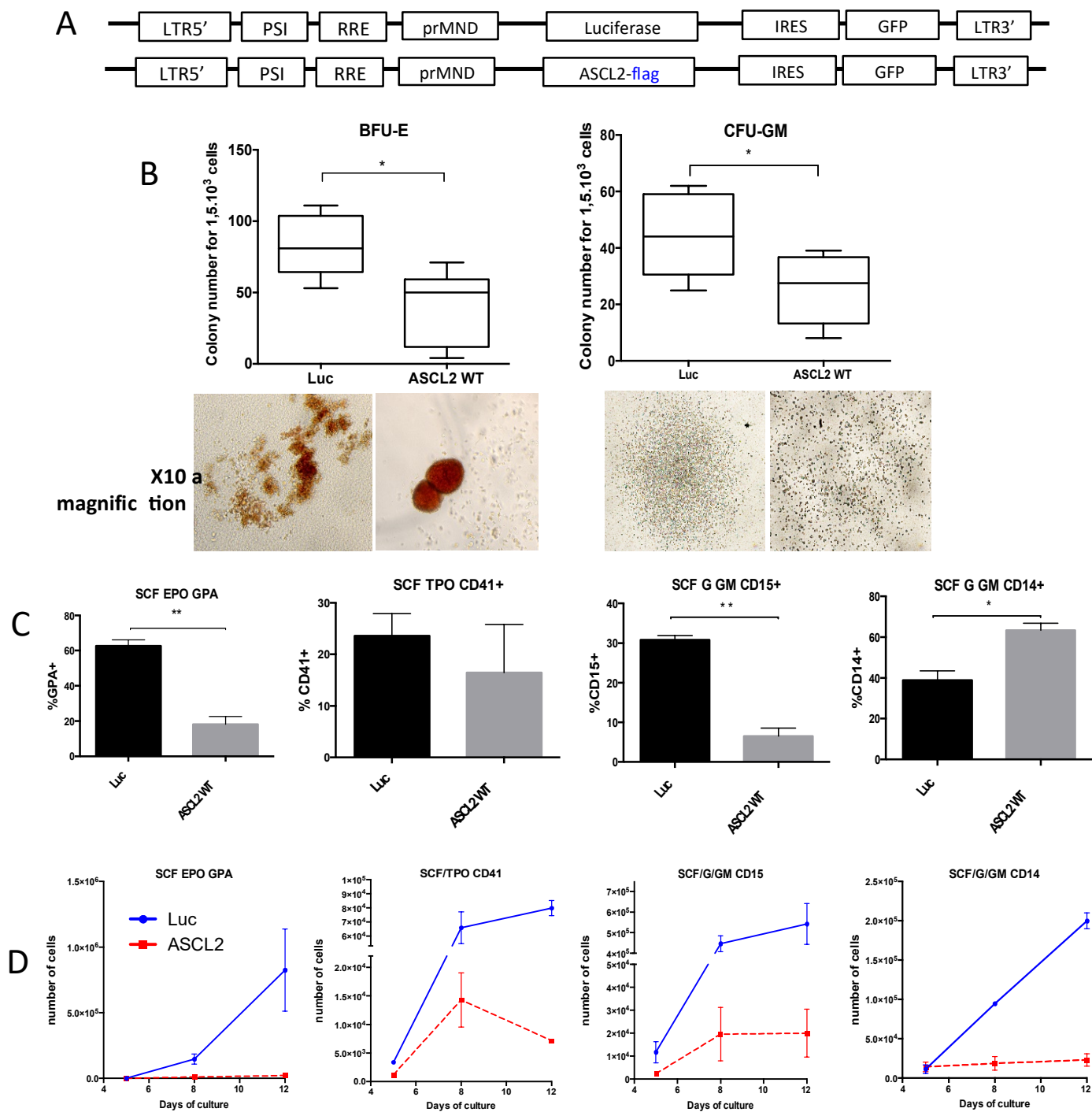


Figure 4

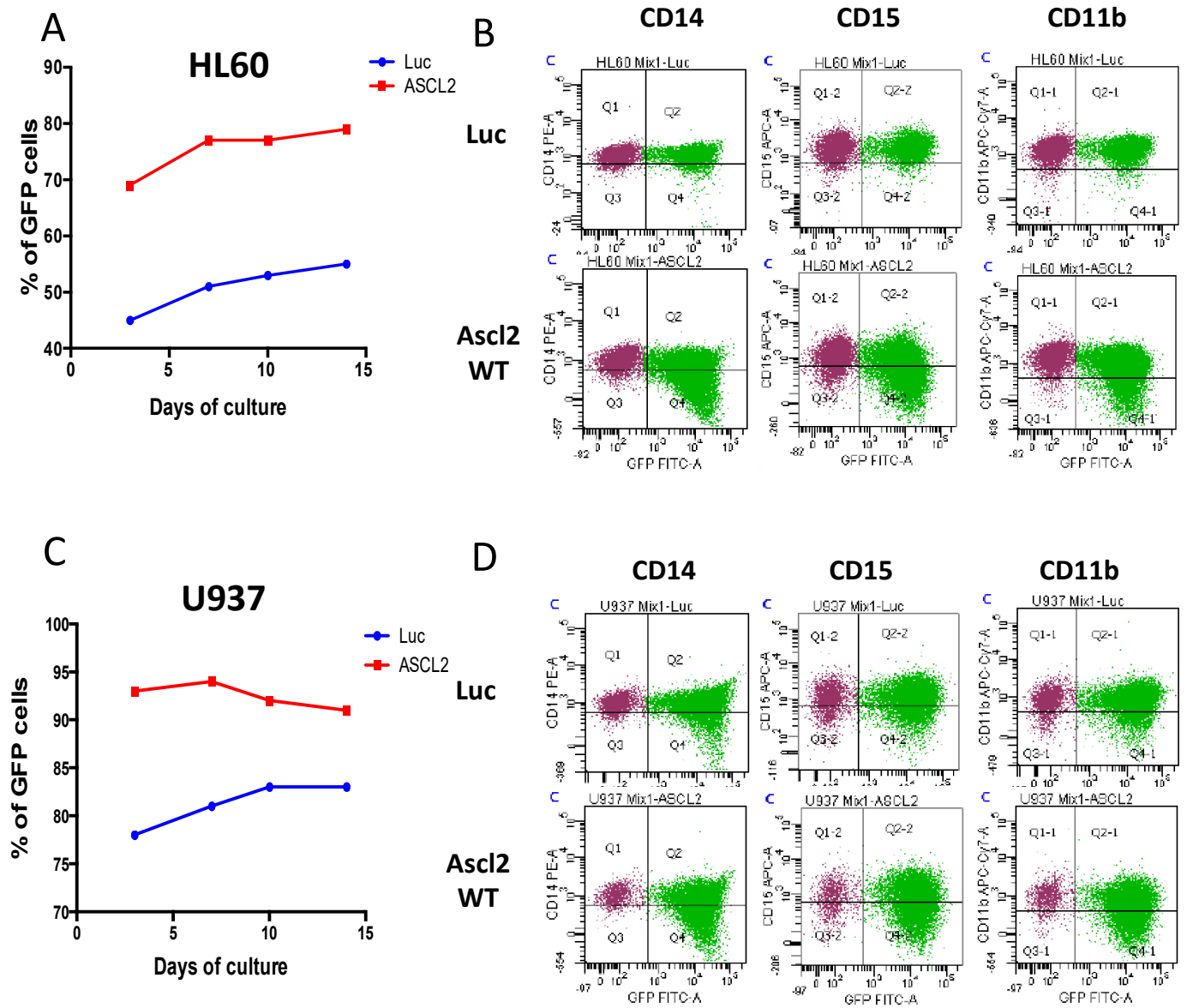


Figure 5

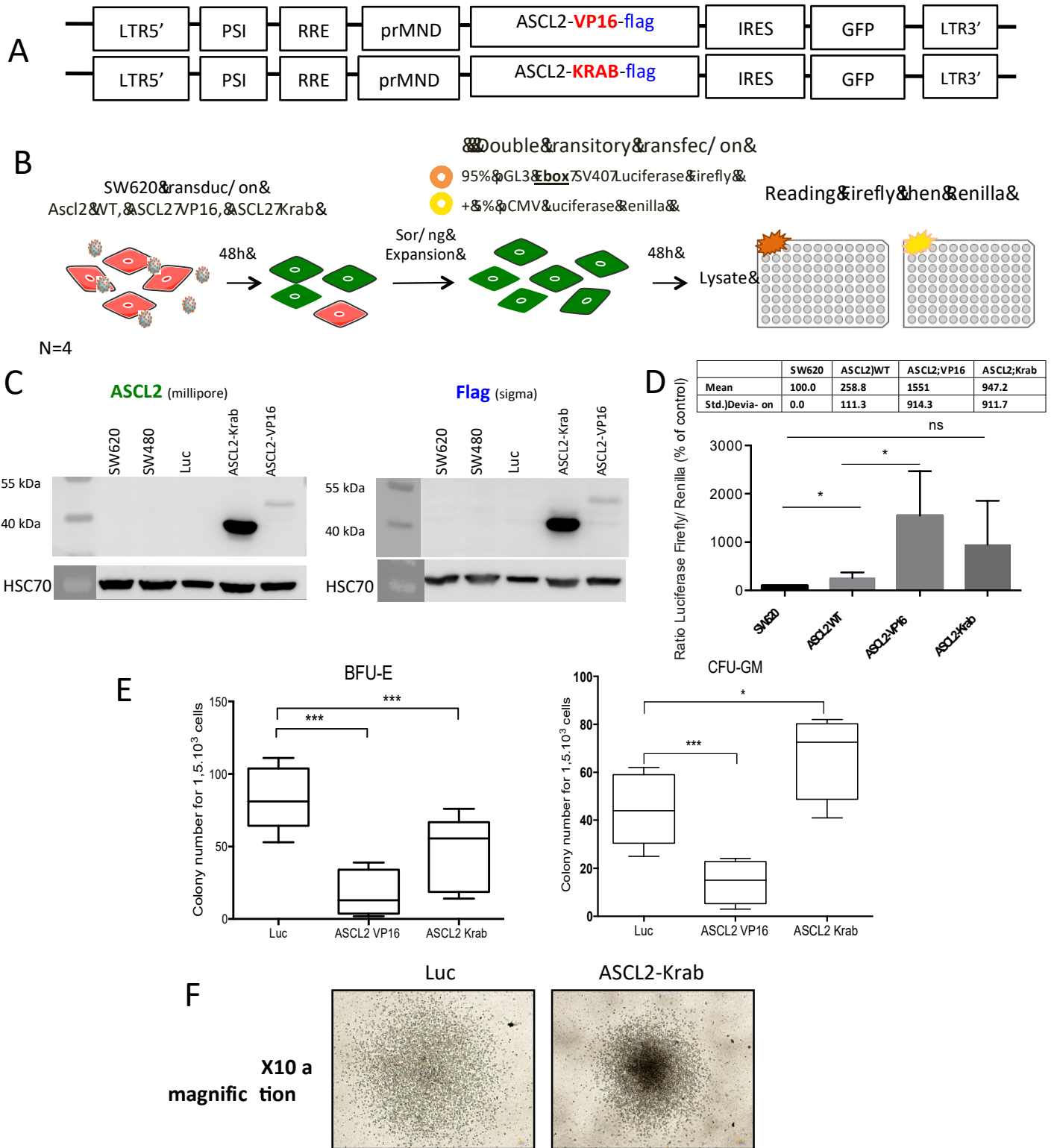
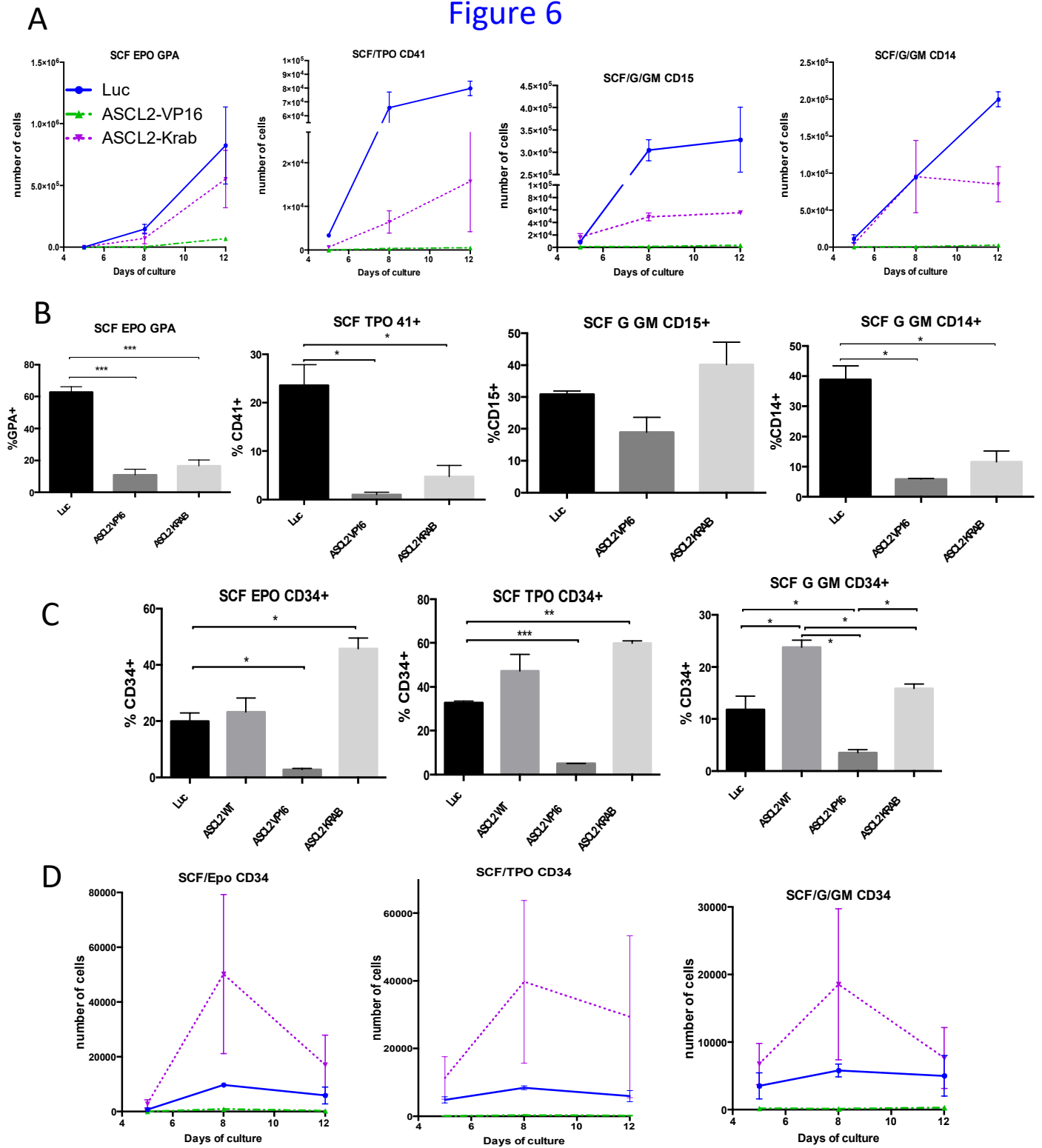
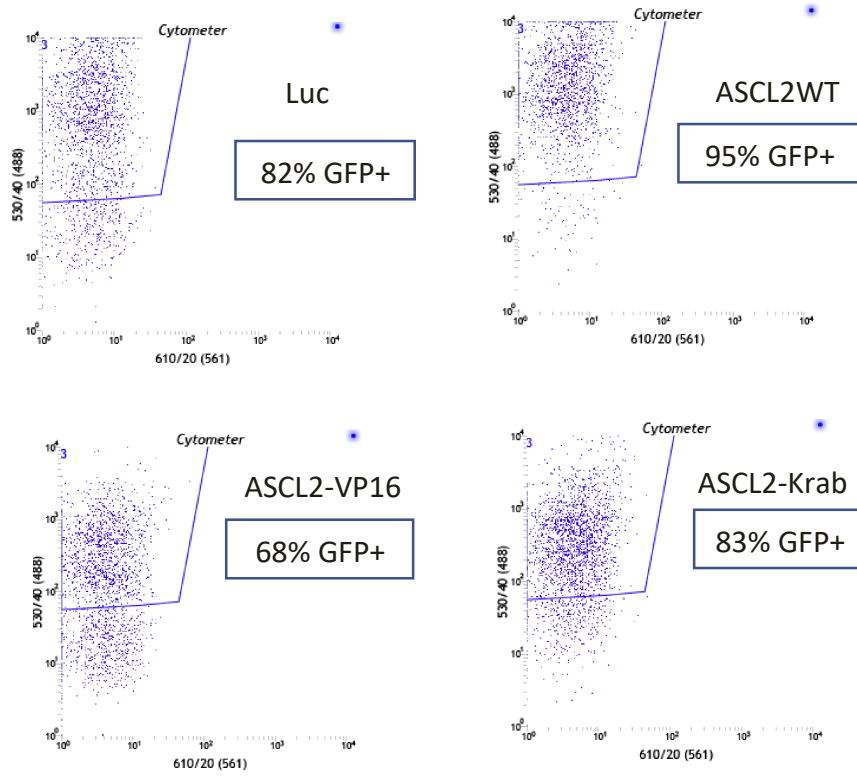


Figure 6



Supplemental Figure 1

Supplemental data : efficacy of transduction in CD34+ cord blood progenitors



Experimental procedures

Human samples

The Local Research Ethics Committee of Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, approved the study. Peripheral blood was collected from 49 AML patients and 4 bone marrows of healthy donors with their informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki. Umbilical cord blood samples were collected from healthy newborns with mothers' consent. Mononuclear cells were separated by standard ficoll techniques. CD34+ cells were separated by double-positive selection using a magnetic cell-sorting system (AutoMACS, Miltenyi Biotech).

Nucleic acid extraction

RNA of primary samples were extracted using Direct-zol kit (Zymo Research). RNA of cell lines were extracted using RNA extraction kit (Macherey-Nagel).

75 RNA of AML samples and 17 RNA of MLL mutated AML samples were obtained from GOELAMSTHEQUE (Cochin, Paris).

Real-time quantitative RT-PCR

Real-time PCR was performed using first-strand cDNA (Superscript II, thermofisher) with an ABI Prism GeneAmp 7500 (Applied Biosystems). Expression levels were calculated as the relative expression ratio compared to two reference genes and relative mRNA expression levels calculated by the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Cell cultures and flow cytometry

SW480, SW620, HEL, HL60, Jurkat, K562, MO7E, THP1, U937, UT7, CEM and Kasumi cell lines were obtained from ATCC. Monomac-1 cell line was obtained from DSMZ. Cell lines were cultured following manufacturers' protocols. Molm-14 was kindly provided by H. Souchet, Institut Imagine, Paris) and cultured in RPMI 1640 with 10% FBS and 1% penicilline-streptomycine.

CD34+ cells were grown in liquid cultures using BIT 9500 serum substitute medium, stimulating erythroid, granulomonocytic, or monocyte/macrophage differentiation with SCF (25 ng/mL), IL-3 (10 IU/mL), erythropoietin (EPO; 3 IU/mL), thrombopoietin (TPO; 10ng/mL), Fms-like tyrosine kinase-3–ligand (FLT3-L; 10 ng/mL), G-CSF (10 ng/mL) or GM-CSF (20 ng/mL) all from Peprotech. Cord blood CD34+ cells were seeded at 1million/mL prior to transduction or 0,1million/mL for differentiation. Morphology was examined after May-Grunwald-Giemsa staining of cytopsin cells (supplementary Fig1). For sorting or immunophenotypic analyses, cells were labeled with anti-CD14–PB, anti-CD15–APC, anti-CD19–PE, anti-CD36–APC, anti-GPA-PE, anti-CD41-APC, anti-CD3-APC, anti-CD4-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD42-APC, anti-CD11b-APC-cy7 (BD Biosciences), anti-CD34–PC7, anti-CD15-FITC, anti-CD56–PC7 (Beckman Coulter) antibodies. TWS119 (Sigma) was resuspended in DMSO as manufacturer's recommendation.

Cells were sorted using FACS Aria III or Influx cell sorters (BD Biosciences, NJ, USA).

Methylcellulose assays were performed using sorted GFP+ cells, 1500 cells per well, each well in duplicate and grown for fourteen days before counting or replating. Replating was done with 100.000 cells per well, each well in duplicate.

Expression vectors

ASCL2 was sequence optimized (Genewiz) and cloned in a lentivirale vector (pTrip-MND-IRES-GFP provided by F. Pflumio, CEA, L'Hay-les-Roses). ASCL2 modifications by addition of VP16 sequence or Krab sequence were performed using PCR from pPRIG constructs (provided by O. Albagli, Cochin, Paris) and In-Fusion recombination technology (Clontech). pGL3 with specific triple E-Box CAGGTG was kindly provided by C. Smas (Toledo, USA). pCMV renilla came from Promega.

Cell transfection and luciferase assays

SW620 cell line was transfected with jet prime (polyplus transfection) respecting manufacturer's recommendations with a ratio a 95% pGL3 firefly/ 5% pCMV renilla. After 48h, cells were lysed and analysed following Dual-glo luciferase assay on GLOMAX plate reader (Promega). Plasmids were purified using an Midi-prep Kit (Macherey-Nagel).

Western blotting

SW620 cell line transduced with the different constructs and sorted on GFP expression were amplified and then lysed with Laemmli +10% DTT 1M. Cell lysates were separated by SDS-PAGE 10% polyacrylamide and transferred to a nitrocellulose membrane. HSC70 was used as control. The membrane was probed overnight at 4°C with a specific primary antibody (anti-ASCL2 MAB4418 clone 7E2 Millipore, anti-Flag M2 F3165 Sigma), washed, probed with a secondary antibody anti-mouse HRP-coupled. Membranes were revealed with Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (ThermoFisher) and detected by ImageQuant LAS 4000 (GE healthcare).

Cell transduction

CD34+ cells (1×10^5 /mL) were prestimulated for 18 hours with TPO, IL-3, SCF, and FLT3-L in 100uL BIT 9500 serum substitute medium (1X). Lentivirale particles were added at a concentration corresponding to 5×10^6 particles for 1×10^5 cells with overnight incubation.

Transplantation assays with fetal liver (FL).

The transplantation assays performed with FL cells from embryos into lethally irradiated C57BL/6J-Ly5.1 mice were described previously (Foudi *et al.*, 2006). C57BL/6J (Ly5.2 and Ly5.1) mice were purchased from Charles River and Harlan laboratories, respectively. For reconstitution assays, blasts cells from C57BL/6-Ly5.1 mice were cultured few hours in DMEM medium supplemented with 10% FBS. Donor-specific anti-CD45.2 and recipient-specific anti-CD45.1 antibodies were used to discriminate donor-derived cells from recipient cells. The Gustave Roussy Animal Care Committee approved all procedures.

ASCL2 knockdown by lentiviral delivery of shRNA

ShRNA targeting ASCL2 (Sigma) was cloned by PCR with their U6 promoter into a lentiviral vector (pRRLsin-PGK-eGFP-WPRE, Genethon) using In-Fusion recombination technology (Clontech). Murine leukemic cells were transduced as previously described with lentiviruses expressing the green fluorescent protein (GFP) and either shRNA-ASCL2 (Sigma) TRCN0000108527 (5-CCGCGTAAAGCTGGTAAACTT-3), TRCN0000448085 (5-GAAACCTGG GCCTATGCCTTA-3), TRCN0000447757 (5-TTAAGCTTGGAGCACAAT AAA-3) or shRNA-scramble (5-GCCGGCAGCTAGCGACCCAT-3) as control. ASCL2 knockdown was assessed by qRT-PCR.

Statistical Analysis. Results given as mean \pm standard SEM were analyzed with the two-tailed unpaired Student's *t*-test. Differences were considered significant when P-value was *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$, ****, $p < 0.0001$.

Authorship Contributions

MD, YZ, LH, VB performed experiments and analyzed data. OA critical read the manuscript and scientifically advised procedures and results. RT, OL, MCB, FD provided facilities. CD, TD, VJ performed bioinformatic and computational analysis. MD and FL conceived the project, analyzed data and wrote the paper. All authors contributed to writing and editing.

Acknowledgments

Agence Nationale de la Recherche (ANR, (FL), the Foundation de France (FL) and DIM Stempole (FL) supported this work. Canceropole IDF, supported MD and YZ. La ligue contre le cancer supported MD. We thank P. Rameau and Y. Lecluse for cell sorting and the staff of the animal facility of Gustave Roussy, Villejuif, France. The thank Gustave Roussy and Genomic platform for RNaseq funding through the taxe d'apprentissage.

The authors declare no conflict of interest.

Bibliography

- Albagli-Curiel, O., Lécluse, Y., Pognonec, P., Boulukos, K. E. and Martin, P. (2007) 'A new generation of pPRIG-based retroviral vectors.', *BMC biotechnology*, 7, p. 85. doi: 10.1186/1472-6750-7-85.
- Bonnet, D. and Dick, J. E. (1997) 'Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.', *Nature medicine*, 3(7), pp. 730–737. doi: 10.1038/nm0797-730.
- Conway, K., Edmiston, S. N., May, R., Kuan, P. F., Chu, H., Bryant, C., Tse, C.-K., Swift-Scanlan, T., Geradts, J., Troester, M. A. and Millikan, R. C. (2014) 'DNA methylation profiling in the Carolina Breast Cancer Study defines cancer subclasses differing in clinicopathologic characteristics and survival.', *Breast cancer research : BCR*, 16(5), p. 450. doi: 10.1186/s13058-014-0450-6.
- Dessein, A. F., Stechly, L., Jonckheere, N., Dumont, P., Monté, D., Leteurtre, E., Truant, S., Pruvot, F. R., Figeac, M., Hebbar, M., Lecellier, C. H., Lesuffleur, T., Dessein, R., Grard, G., Dejonghe, M. J., De Launoit, Y., Furuichi, Y., Prévost, G., Porchet, N., Gespach, C. and Huet, G. (2010) 'Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells', *Cancer Research*, 70(11), pp. 4644–4654. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3828.
- van der Flier, L. G., van Gijn, M. E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegbarth, A., Stange, D. E., Begthel, H., van den Born, M., Guryev, V., Oving, I., van Es, J. H., Barker, N., Peters, P. J., van de Wetering, M. and Clevers, H. (2009) 'Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate', *Cell*. Elsevier Ltd, 136(5), pp. 903–912. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.031.
- Foudi, A., Jarrier, P., Zhang, Y., Wittner, M., Geay, J. F., Lecluse, Y., Nagasawa, T., Vainchenker, W. and Louache, F. (2006) 'Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4^{-/-} chimeric mice', *Blood*, 107, pp. 2243–2251. doi: 10.1182/blood-2005-02-0581.
- Guillemot, F., Nagy, a, Auerbach, a, Rossant, J. and Joyner, a L. (1994) 'Essential role of Mash-2 in extraembryonic development.', *Nature*, pp. 333–336. doi: 10.1038/371333a0.
- Hu, X., Chen, L., Wang, Q., Zhao, X., Tan, J., Cui, Y., Liu, X., Zhang, X. and Bian, X. (2015) 'Elevated expression of ASCL2 is an independent prognostic indicator in lung squamous cell carcinoma', *Journal of Clinical Pathology*, p. jclinpath-2015-203025. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203025.
- Kury, P., Greiner-Petter, R., Cornely, C., Jurgens, T. and Muller, H. W. (2002) 'Mammalian achaete scute homolog 2 is expressed in the adult sciatic nerve and regulates the expression of Krox24, Mob-1, CXCR4, and p57kip2 in Schwann cells', *J Neurosci*, 22(17), pp. 7586–7595. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1777-02.2002
- Kwon, O. H., Park, J. L., Baek, S. J., Noh, S. M., Song, K. S., Kim, S. Y. and Kim, Y. S. (2013) 'Aberrant upregulation of ASCL2 by promoter demethylation promotes the growth and resistance to 5-fluorouracil of gastric cancer cells', *Cancer Science*, 104(3), pp. 391–397. doi: 10.1111/cas.12076.
- Lavau, C., Luo, R. T., Du, C. and Thirman, M. J. (2000) 'Retrovirus-mediated gene transfer of MLL-ELL transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), pp. 10984–9. doi: 10.1073/pnas.190167297.
- Liedtke, M. and Cleary, M. L. (2009) 'Therapeutic targeting of MLL', *Blood*, 113(24), pp. 6061–6068. doi: 10.1182/blood-2008-12-197061.
- Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S. and Parker, M. G. (1995) 'A modified oestrogen receptor ligand-binding domain has an improved switch for the regulation of heterologous proteins', *Methods*, 23(27), pp. 1686–1690.
- Liu, M.-H., Cui, Y.-H., Guo, Q.-N. and Zhou, Y. (2016) 'Elevated ASCL2 expression is associated with metastasis of osteosarcoma and predicts poor prognosis of the patients.', *American journal of cancer research*, 6(6), pp. 1431–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27429855>.
- Liu, X., Chen, X., Zhong, B., Wang, A., Wang, X., Chu, F., Nurieva, R. I., Yan, X., Chen, P., van der Flier, L. G., Nakatsukasa, H., Neelapu, S. S., Chen, W., Clevers, H., Tian, Q., Qi, H., Wei, L., Dong, C. and Flier, L. G. Van Der (2014) 'Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development', *Nature*. Nature Publishing Group, 507(7493), pp. 513–518. doi: 10.1038/nature12910.
- Margolin, J. F., Friedman, J. R., Meyer, W. K., Vissing, H., Thiesen, H. J. and Rauscher, F. J. (1994) 'Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), pp. 4509–13. doi: 10.1073/pnas.91.10.4509.
- Nusse, R. and Clevers, H. (2017) 'Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities', *Cell*. Elsevier Inc., 169(6), pp. 985–999. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016.
- Schuijers, J., Junker, J. P., Mokry, M., Hatzis, P., Koo, B. K., Sasselli, V., Van Der Flier, L. G., Cuppen, E., Van Oudenaarden, A. and Clevers, H. (2015) 'Ascl2 acts as an R-spondin/wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 16(2), pp. 158–170. doi: 10.1016/j.stem.2015.02.005.

10.1016/j.stem.2014.12.006.

Somervaille, T. C. P. and Cleary, M. L. (2006) 'Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia', *Cancer Cell*, 10(4), pp. 257–268. doi:

10.1016/j.ccr.2006.08.020.

de Sousa E Melo, F., Colak, S., Buikhuisen, J., Koster, J., Cameron, K., de Jong, J. H., Tuynman, J. B., Prasetyanti, P. R., Fessler, E., van den Bergh, S. P., Rodermond, H., Dekker, E., van der Loos, C. M., Pals, S. T., van de Vijver, M. J., Versteeg, R., Richel, D. J., Vermeulen, L. and Medema, J. P. (2011) 'Methylation of Cancer-Stem-Cell-Associated Wnt Target Genes Predicts Poor Prognosis in Colorectal Cancer Patients', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 9(5), pp. 476–485. doi: 10.1016/j.stem.2011.10.008.

Wang, C., Wang, M., Arrington, J., Shan, T., Yue, F., Nie, Y., Tao, W. A. and Kuang, S. (2017) 'Ascl2 inhibits myogenesis by antagonizing the transcriptional activity of myogenic regulatory factors.', *Development (Cambridge, England)*, 144(2), pp. 235–247. doi: 10.1242/dev.138099.

Wentzensen, N., Bakkum-Gamez, J. N., Killian, J. K., Sampson, J., Guido, R., Glass, A., Adams, L., Luhn, P., Brinton, L. A., Rush, B., D'Ambrosio, L., Gunja, M., Yang, H. P., Garcia-Closas, M., Lacey, J. V., Lissowska, J., Podratz, K., Meltzer, P., Shridhar, V. and Sherman, M. E. (2014) 'Discovery and validation of methylation markers for endometrial cancer', *International Journal of Cancer*, 135(8), pp. 1860–1868. doi: 10.1002/ijc.28843.

Discussion

L'axe CXCR4/CXCL12 régule la biologie des CSH normales et leucémiques. Malgré de nombreuses études, les mécanismes impliqués dans ses fonctions et son mode de régulation restent à éclaircir. Dans ce travail, nous avons testé l'hypothèse d'un rôle possible de CXCR4 dans la régulation des ROS. Cette hypothèse a été testée uniquement dans les cellules souches normales et fait l'objet de la première partie de mon travail. Par ailleurs, nous avons étudié l'expression et la fonction du facteur de transcription ASCL2 avec l'hypothèse sous jacente de sa connexion avec la voie de signalisation de CXCR4 dans le contexte des pathologies myéloïdes.

Première partie: Rôle de l'axe CXCR4/CXCL12 dans la régulation du stress oxydatif des cellules souches hématopoïétiques.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites durant la respiration oxydative en réponse à des événements de stress, tels que les irradiations ionisantes ou les traitements génotoxiques. Dans l'hématopoïèse, de faibles quantités de ROS jouent un rôle physiologique dans différents processus, dont la différenciation et la migration cellulaire. Cependant, à fortes doses, les ROS sont responsables de l'oxydation des constituants cellulaires, activent les voies d'apoptose et conduisent à la sénescence et à l'épuisement prématuré des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les mécanismes qui régulent le niveau de ROS dans les CSH ne sont pas élucidés et le rôle du microenvironnement dans cette régulation n'a pas été étudié. Dans ce travail, nous avons testé l'hypothèse que microenvironnement au travers de la chimiokine CXCL12 et son récepteur CXCR4 est impliqué dans la régulation des réponses au stress oxydatif des CSH.

Les souris chimériques *Cxcr4*^{-/-}, générées par transplantation de cellules de foie fœtal *CXCR4*^{+/+} ou *CXCR4*^{-/-} à des souris létalement irradiées, présentent une diminution progressive de l'hématopoïèse, une augmentation des ROS endogènes et une activation de la voie P38MAPK. Les défauts de fonction des CSH *Cxcr4*^{-/-}, à savoir une augmentation du pourcentage des CSH apoptotiques, une augmentation de la phosphorylation de p38MAPK et des cassures d'ADN double-brins, sont

revertés *in vivo* par un traitement par l'antioxydant N-acétyl-L-cystéine (NAC). Le NAC diminue également la déplétion des CSH *Cxcr4*^{-/-} sans cependant restaurer leur quiescence, suggérant que la sortie de quiescence n'est pas responsable de la perte des CSH.

Dans ce travail, nous avons utilisé un modèle murin sans induction de la délétion de CXCR4, contrairement aux modèles développés antérieurement, afin de s'affranchir de l'utilisation de molécules potentiellement responsables de stress (poly-IC et tamoxifène). Il a effectivement été démontré que l'utilisation de ces molécules génère du stress dans des souris non-génétiquement modifiées (Walter *et al.*, 2015; Sánchez-Aguilera and Méndez-Ferrer, 2016). Notre modèle confirme l'incapacité des CSH *cxcr4*^{-/-} à maintenir l'hématopoïèse, à l'instar du modèle murin utilisant le poly IC pour déléter *CXCR4*. Il est cependant nécessaire de reconnaître que la manipulation des cellules de foie fœtal peut également être considérée comme un stress. Cette suggestion fait le lien avec la publication de Mantel en 2015 démontrant que les CSH manipulées à l'air ambiant, un contexte non physiologique, souffrent d'un « choc à l'oxygène » induisant une production de ROS et une augmentation des mégapores mitochondriaux (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) *via* la cyclophiline D et p53, conduisant les CSH à l'apoptose (Mantel *et al.*, 2015). Le mPTP est le reflet de l'accroissement soudain de la perméabilité membrane interne de la mitochondrie pour l'eau, les ions et les substances dissoutes, produisant une dissipation du gradient de protons et un déséquilibre redox. En utilisant l'inhibiteur de mPTP, la cyclosporine A, les CSH sont protégées du stress oxydatif durant leur manipulation à l'air ambiant et montrent des capacités de greffe améliorées. Dans notre expérience, on ne peut pas exclure non plus que l'irradiation des souris receveuses génère une modification significative de l'équilibre des ROS au niveau du stroma. Il est donc possible que les effets des ROS observés ne soient pas uniquement le reflet de la délétion de CXCR4 mais également du stress généré expérimentalement. On peut s'interroger sur la capacité de greffe de cellules « fragilisées » par la délétion de CXCR4 dans un contexte stromal stressé par l'irradiation. Il serait alors intéressant de traiter les souris receveuses par un antioxydant en amont de la greffe pour limiter les effets d'un stress sur l'environnement receveur, permettant d'observer uniquement la capacité des cellules de foie fœtal de répondre au stress de la greffe.

Des travaux précédents de notre équipe ont démontré que la délétion de CXCR4 n'altère pas le homing des CSH mais induit une diminution de la rétention des cellules souches dans la moelle (Foudi, 2006). Des travaux ont montré que les progéniteurs murins sortant de leur niche changent de métabolisme : d'un métabolisme glycolytique dans les niches, les CSPH en circulation adoptent préférentiellement la respiration mitochondriale qui est plus prompte à la production de ROS (Simsek 2010). L'une des hypothèses que nous pouvons avancer est qu'en l'absence de CXCR4, les CSPH sont davantage en circulation et coupées de leur source de CXCL12. En manque de CXCL12, les CSPH ne pourraient plus équilibrer leur statut redox et auraient un vieillissement accéléré.

Pour récapituler les effets du stress oxydatif *in vitro*, nous avons utilisé l'agent oxydant buthionine-sulfoximine (BSO), qui augmente les ROS en diminuant le niveau intracellulaire de glutathion réduit (GSH) sur des CSH WT. Nos résultats montrent qu'un traitement au CXCL12 des progéniteurs hématopoïétiques exposés au BSO permet de diminuer significativement le niveau de ROS. Le CXCL12 agit comme un agent antioxydant capable de diminuer l'apoptose et les dommages à l'ADN causés par le BSO. De plus, les CSH et les progéniteurs primitifs *Cxcr4*^{-/-} présentent une sensibilité accrue au stress oxydatif induit par une faible dose de l'oxydant BSO en culture *in vitro*. Ce phénomène est reversé par le NAC ou le SB203580, un inhibiteur de la voie p38MAPK.

Il est nécessaire de s'interroger sur la possibilité que les effets observés avec le traitement au CXCL12 puissent aussi être attribués au CXCR7, qui peut également lier le ligand CXCL12. Nous avons observé que les progéniteurs CXCR4^{-/-}, plus sensibles au stress oxydatif, ne récupèrent ni leurs propriétés à former des colonies en milieu semi-solide ni une diminution du niveau de ROS après traitement au CXCL12. Cela suggère que le CXCR7 n'est pas capable de compenser l'absence du CXCR4 et que les effets protecteurs du stress oxydatif soient uniquement attribués à l'axe CXCR4/CXCL12. On peut cependant noter que malgré l'absence de CXCR4, les cellules de foie fœtal sont capables de reconstituer l'hématopoïèse des souris receveuses et d'autant plus que sur les temps les plus courts, elles montrent de meilleures capacités de reconstitution que les cellules WT. Cela suggère que les cellules hématopoïétiques ont recours à d'autres voies de

signalisation pour assurer leur domiciliation au sein de la moelle osseuse. Il est probable qu'en l'absence de CXCR4 ce soit CXCR7 qui permette aux cellules de foie fœtal de rejoindre la moelle par chimiotactisme du CXCL12.

Sur le plan mécanistique, nous nous sommes demandés quelle est l'origine des ROS observés dans les cellules CXCR4^{-/-}. *In vitro*, nos études préliminaires montrent que le niveau de ROS de cellules traitées à la roténone, un inhibiteur spécifique du complexe I de la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie est diminué par l'addition de CXCL12. La protéine p66^{Shc} dans sa forme phosphorylée contrôle le statut redox intracellulaire par oxydation mitochondriale du cytochrome C, aboutissant à une élévation rapide du niveau de ROS. Les souris KO p66^{Shc} ont une durée de vie prolongée et sont protégées des pathologies associées au vieillissement. Le menadion induit la phosphorylation rapide de la protéine redox p66^{Shc} qui peut être prévenue par l'addition de CXCL12. L'action rapide du CXCL12, capable de réguler le stress oxydatif en quelques minutes, nous laisse à penser que l'axe CXCR4/CXCL12 pourrait réguler le statut redox mitochondrial en régulant directement la phosphorylation de p66^{Shc}. Nous pourrions débiter l'étude de p66^{Shc} *in vitro* avec l'expression d'une forme active de p66^{Shc} où nous devrions observer un haut niveau de ROS et une augmentation de l'apoptose des cellules. Ces effets seraient inhibés par l'addition de CXCL12 si CXCR4 est exprimé. A l'inverse dans des cellules exprimant CXCR4 et une forme dominant négatif de p66^{Shc} ou un shRNA ciblant p66^{Shc}, un stress oxydatif induit par le menadion ne devrait pas augmenter le niveau de ROS. Pour aller plus loin nous pourrions étudier *in vivo* les capacités de reconstitution des CSH de foie fœtal issues de souris double KO *cxcr4* et p66^{Shc}. Si notre proposition est exacte alors les effets délétères imputés à la délétion de CXCR4 seraient abolis par la délétion de p66^{Shc}. Pour la première fois, nous démontrons le rôle protecteur de l'axe CXCR4/CXCL12 contre le stress oxydatif dans les CSH et ouvrons de nombreuses perspectives sur l'utilisation d'agonistes de CXCR4 et d'agents antioxydants pour diminuer les effets délétères des ROS qui sont associés à la mobilisation ou à la transplantation.

Il a été montré que le stroma participe au maintien des cellules souches leucémiques. Notre travail sur les cellules souches et progéniteurs sains pourrait

être poursuivi en étudiant la participation de CXCR4 au stress oxydatif des cellules leucémiques.

Deuxième partie: Implication du facteur de transcription ASCL2 dans l'hématopoïèse normale et les leucémies aiguës myéloïdes.

En parallèle, en s'interrogeant sur les rôles de CXCR4 dans les cellules souches, la littérature nous a poussé à nous interroger sur le rôle potentiel du facteur de transcription à bHLH ASCL2 (Achaete Scute-like 2) dans les CSH. En effet, ASCL2 est impliqué dans le maintien de l'identité des cellules souches intestinales où sa surexpression induit une hyperplasie intestinale alors que son inhibition induit une perte des cellules souches intestinales (Jubb *et al.*, 2006). Dans ce contexte, il participe à la régulation de l'expression du récepteur de chimiokine CXCR4 et inversement, son expression est régulée par CXCR4 et la voie Wnt suggérant une boucle de régulation entre CXCR4 et ASCL2 (Hu *et al.*, 2015). Il est intéressant de noter qu'ASCL2 est davantage exprimé dans la lignée SW620, issue d'une tumeur métastatique, que dans la lignée SW480 issue de la tumeur colorectale primaire du même patient. Cela suggère une corrélation entre le niveau d'expression d'ASCL2 et la migration ou la capacité d'échappement métastatique. Il n'existe aucune donnée sur l'expression et la fonction d'ASCL2 dans l'hématopoïèse et les hémopathies malignes. Ce travail vise à analyser l'expression et la fonction d'ASCL2 dans l'hématopoïèse normale et comprendre son implication dans le développement des leucémies aiguës myéloïdes (LAM).

L'expression d'ASCL2 a été analysée en qRT-PCR dans les cellules hématopoïétiques humaines saines et dans 135 échantillons de LAM. ASCL2 est faiblement exprimé dans les cellules hématopoïétiques matures et les progéniteurs, à l'exception des cellules NK et des monocytes. 32% des LAM (135 échantillons) ont une expression au moins deux fois plus élevée d'ASCL2 que les progéniteurs CD34+ normaux issus de moelle de donneurs sains. L'expression d'ASCL2 est élevée dans les LAM et le niveau d'expression d'ASCL2 corrèle positivement avec le mauvais pronostic. La première question posée par ce travail est « pourquoi l'expression d'ASCL2 est augmentée dans les LAM ? » Il a été décrit qu'ASCL2 est une cible de la voie Wnt et nous avons confirmé que les cellules CD34+ issues de cordon ombilical traitées avec le TWS119, un agoniste de Wnt, ont

une expression d'ASCL2 augmentée. Il est possible que les LAM montrant un haut niveau d'expression d'ASCL2 soient associées à des dérégulations de la voie Wnt. Nous pourrions mettre en place un protocole simple consistant à tester les effets d'un inhibiteur de la voie Wnt tels que le DKK-1 (Glinka *et al.*, 1998) sur la prolifération, la migration ou la différenciation sur des échantillons de LAM et observer si la réponse varie selon le niveau d'expression d'ASCL2.

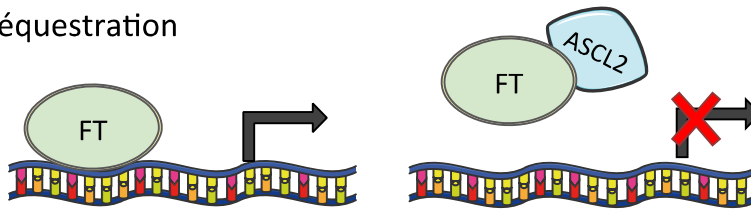
Il est également possible qu'une dérégulation de la méthylation du gène d'ASCL2 soit à l'origine des changements d'expression observés. En effet, plusieurs articles rapportent une modification de la méthylation du promoteur d'ASCL2 associée à un pronostic défavorable. Il faut noter que le statut de méthylation et l'expression d'ASCL2 sont tissu-dépendant car il a été rapporté que l'expression d'ASCL2 est augmentée dans certains sous-types de cancer colorectal mais pas dans le cancer colorectal de stade II où son expression est diminuée et associée à une hyperméthylation de son promoteur (de Sousa E Melo *et al.*, 2011). Par ailleurs, alors que son niveau d'expression est augmenté et son promoteur déméthylé dans les cancers gastriques (Kwon *et al.*, 2013), le promoteur d'ASCL2 est hyperméthylé dans les carcinomes endométriaux et les cancers du sein de sous-type luminal par rapport aux tissus sains correspondants (Conway *et al.*, 2014; Wentzensen *et al.*, 2014). Dans le cancer gastrique, une augmentation de l'expression d'ASCL2 corrèle avec le mauvais pronostic et une surexpression ectopique de ce gène entraîne une augmentation de la résistance au 5-Fluorouracil (Kwon *et al.*, 2013). En 2005, il a été rapporté que JMJD2A/KDM4A, un membre de la famille jumonji domaine 2/ KDM4, agit comme répresseur de la transcription et inhibe l'expression d'ASCL2. C'est une protéine qui a une fonction déméthylase spécifique des triméthylations mais qui est capable de recruter NCOR1 pour réprimer l'expression de gènes (Agger *et al.*, 2016).

Comme tout facteur de transcription, ASCL2 peut avoir des fonctions de transactivation ou de répression en fonction du contexte cellulaire et des cofacteurs présents à un moment donné de la différenciation. Afin de comprendre sa fonction et de déterminer l'impact de sa surexpression dans l'hématopoïèse, nous avons développé des vecteurs de surexpression d'ASCL2 dans un vecteur lentiviral contenant un promoteur fort d'origine viral (MND). Les conséquences de

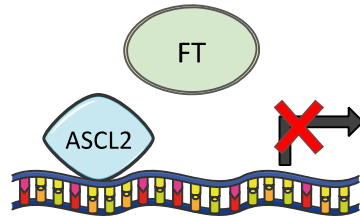
sa surexpression induite par transduction lentivirale de la forme WT et de formes modifiées par l'ajout de VP16 (transactivation) ou de KRAB (transrépression) pour forcer l'activité du facteur de transcription, ont été étudiées dans des progéniteurs CD34+ humains et les lignées de LAM HL-60 et U937. La surexpression de la forme sauvage d'ASCL2 dans des progéniteurs CD34+ induit une diminution du potentiel clonal des progéniteurs myéloïdes et une quasi-disparition des progéniteurs érythroïdes en méthylcellulose par rapport au contrôle. Cette inhibition de la prolifération est accentuée lors de la surexpression de la forme transactivatrice ASCL2-VP16. Elle induit une perte totale de la clonogénicité alors que la surexpression d'ASCL2-KRAB, forme transrépressive, induit une perte des progéniteurs érythroïdes mais une augmentation du nombre de colonies myéloïdes. Les effets inhibiteurs de la surexpression observés sur la prolifération sont en opposition avec les résultats obtenus sur les cellules intestinales mais sont davantage en adéquation avec l'impact négatif de la surexpression d'ASCL2 sur la prolifération des progéniteurs myogéniques (Wang *et al.*, 2017). La surexpression dans les cellules de Schwann murines est également responsable d'une inhibition de la prolifération et associée à une augmentation d'expression de CXCR4. En cas de lésion nerveuse, l'expression d'ASCL2 diminue. Cela renforce l'hypothèse que le niveau d'expression d'ASCL2 soit tissu-dépendant.

Les importants effets inhibiteurs d'ASCL2 sur la prolifération pourraient être attribués à plusieurs mécanismes tels que 1) la capacité à séquestrer d'autres E-protéines dans un complexe inactif, 2) la compétition, 3) la capacité à agir comme coactivateur ou corépresseur et/ou 4) la dérégulation du niveau d'expression d'ASCL2 modifie le programme transcriptionnel de la cellule (figure 24).

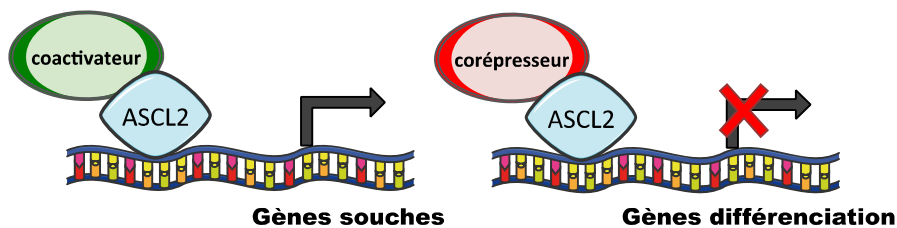
1. Séquestration



2. Compétition



3. Coopération



4. Action directe

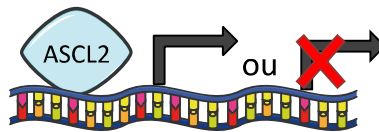


Figure 24 : représentation schématique des mécanismes d'action envisagés pour expliquer la régulation transcriptionnelle induite par ASCL2.

Ce premier mécanisme a également été proposé par Wang pour expliquer comment ASCL2 antagonise l'activité des facteurs de transcription myogénique conduisant à l'inhibition de la prolifération et de la différenciation des myoblastes. En effet, au niveau du domaine basique de liaison à l'ADN, il manque trois acides aminés à ASCL2 par rapport aux bHLH classiques tels que MyoD ou Tal1. ASCL2 pourrait former un hétérodimère inactif avec un autre bHLH, empêchant ses partenaires d'activer la transcription de leurs gènes cibles, un peu à la manière des protéines Id auxquelles ils manquent l'intégralité du domaine basique, empêchant totalement leur liaison à l'ADN. En nous intéressant à ASCL2 dans le contexte de l'hématopoïèse, nous nous sommes interrogés sur ces 3 acides aminés manquants. Il s'avère que de la même manière que pour MyoD, il manque 3 acides aminés à ASCL2 par rapport à TAL1 (figure 25 bas).

	Basic	Helix 1	Loop	Helix 2
TAL	VRRIFTNSRERWR	QQNVNGAFAELRCLI	PTHPPDKKLS	KNEILRLAMKYINFL
ASCL2	-RR-.-NERERNR	VKLVNLGFQALRQHV	PHGGASKKLS	KVETLRSAYEYIRAL
	Basic	Helix 1	Loop	Helix 2
MyoD	RRKAATMRERRR	LSKVNEAFETLKRCT	SSN-PNQLRP	KVEILRNAIKYIEGL
ASCL2	RR---NERERNR	VKLVNLGFQALRQHV	PHGGASKKLS	KVETLRSAYEYIRAL

Figure 25 : Alignement des séquences bHLH de MyoD, Tal1 et ASCL2. ASCL2 présente une absence de 3 acides aminés au centre du domaine basique de liaison à l'ADN.

Par analogie avec le rôle d'ASCL2 dans la myogénèse, ASCL2 pourrait inhiber la fonction de BHLH importantes pour la différenciation hématopoïétique comme par exemple Tal1 ou Lyl1. Pour tester cette hypothèse, nous proposons de réaliser une expérience simple de mesure de luminescence (luciférase) en mettant en compétition ces bHLH Tal1 et ASCL2.

L'expression augmentée d'ASCL2 dans les LAM peut conduire à un déséquilibre entre les différents facteurs de transcription qui entreraient alors en compétition pour réguler leurs gènes cibles.

Il est également possible que dans les modèles de surexpression d'ASCL2, nous soyons face à un niveau d'expression de la protéine qui soit trop élevé et qui soit toxique pour les cellules. Nous poursuivrons l'étude de la surexpression d'ASCL2 en utilisant un vecteur de surexpression contenant un promoteur cellulaire (moins fort que les promoteurs viraux) ou un vecteur d'expression inductible. Nous sommes actuellement en train de construire un vecteur permettant une expression d'ASCL2 inductible par traitement au tamoxifène.

Pour explorer la capacité d'agir comme corépresseur et mieux appréhender ses mécanismes de régulation transcriptionnelle, il est nécessaire d'identifier les partenaires d'ASCL2 dans le contexte de l'hématopoïèse. Des techniques de co-immunoprécipitations permettraient d'identifier les partenaires d'ASCL2. Pour le moment, nous n'avons pas été capables de mettre en évidence par western blot l'expression protéique endogène d'ASCL2 dans les différents modèles utilisés mais uniquement la surexpression induite par nos vecteurs lentiviraux. Nous travaillons à la mise au point d'extractions protéiques nucléaires et testons différents

anticorps anti-ASCL2 disponibles sur le marché afin d'identifier un anticorps suffisamment spécifique pour réaliser des co-immunoprécipitations.

Enfin, pour évaluer la possibilité d'une action répressive directe par ASCL2, nous pouvons remplacer le domaine basique ou l'intégralité du domaine bHLH d'ASCL2 par celui d'un autre facteur de transcription à bHLH (Tal1 ou HIF-1 α) et étudier les effets sur la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques.

Nous avons observé qu'ASCL2 est fortement exprimé par les monocytes et l'utilisation de la construction ASCL2-Krab révèle une amplification du compartiment myéloïde. Il est possible qu'ASCL2 trouve son/ses partenaires biologiques dans le compartiment monocyttaire. Il serait intéressant d'utiliser des shRNA ciblant ASCL2 dans des progéniteurs monocytaires ou des souris ayant une délétion conditionnelle d'ASCL2 dans le compartiment hématopoïétique pour définir l'impact de l'absence d'ASCL2 sur le développement monocyttaire. Il a été montré dans les lymphocytes T qu'ASCL2 inhibe la différenciation des sous-populations Th1, Th2 et Th17 mais que son expression est nécessaire au développement de la sous-population spécifique T folliculaire helper. Il est donc possible qu'ASCL2 agisse comme un checkpoint de différenciation impliqué dans la maturation de certains lignages cellulaires.

Les effets de la perte de fonction d'ASCL2 sur la leucémogénèse ont été analysés dans un modèle de leucémie murine induite par MLL-ENL. Nous avons fait le choix de ce modèle car le rôle de la voie Wnt a été largement décrit dans les leucémies induites par les protéines de fusion MLL. De plus, nous avons trouvé qu'ASCL2 est bien exprimé dans les blastes leucémiques murins transformés par MLL-ENL. Dans le modèle de leucémie murine induite par MLL-ENL, la diminution d'expression d'ASCL2 par des shRNA entraîne une forte diminution du nombre de cellules leucémiques *in vitro* et *in vivo* et un retard dans la progression leucémique résultant en une amélioration de la survie des souris leucémiques. Il serait désormais intéressant de poursuivre ce travail en développant des shRNA ciblant ASCL2 humain et en transduisant des cellules de patients LAM. Nous pourrions ainsi valider l'importance de l'expression d'ASCL2 dans le processus de

leucémogénèse et cela pourrait nous permettre d'identifier par quelles voies ASCL2 régule la prolifération et la différenciation.

L'une des perspectives majeures nécessaires à la compréhension des mécanismes d'ASCL2 est d'identifier les cibles régulées par ce gène. Nous allons répondre à cette question en utilisant la technologie du RNAsequencing pour identifier les cibles d'ASCL2 dans le modèle *in vitro* utilisant les progéniteurs CD34+ de cordon surexprimant les différentes constructions d'ASCL2. Nous saurons prochainement par quelles voies de signalisation ASCL2 médie ses effets sur la prolifération et la différenciation. Pour aller plus loin, nous validerons les cibles d'ASCL2 par chromatine-immunoprécipitation afin d'identifier les sites de liaison à l'ADN et les cibles directes d'ASCL2.

Il est intéressant de remarquer que la surexpression seule d'ASCL2 dans un modèle murin de prédisposition aux néoplasies par dérégulation de la voie Wnt (souris APC^{min}) ne suffit pas à la transformation oncogénique (Reed *et al.*, 2012). Nous avons observé un blocage de différenciation associée à une diminution de la prolifération. Il est vraisemblable qu'un second évènement oncogénique associé à la surexpression d'ASCL2 soit nécessaire à la leucémogénèse. Nous pourrions tester cette hypothèse en surexprimant à la fois ASCL2 et un gène préleucémique tel que TET2 ou P53.

Ensemble, ces résultats suggèrent qu'ASCL2 a un rôle majeur dans la prolifération et la différenciation hématopoïétique et que les modifications du niveau d'expression d'ASCL2 participent au développement leucémique.

Bien que plusieurs articles aient décrits des corrélations positives entre ASCL2 et CXCR4, notre travail n'a pas apporté d'arguments sur un rôle régulateur de CXCR4 par ASCL2 (Kury *et al.*, 2002; Dessein *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). En effet, dans les cohortes de LAM que nous avons étudiées, le niveau d'expression d'ASCL2 ne corrèle ni au niveau d'expression en ARNm ni au niveau d'expression protéique de CXCR4. Dans les lignées HL-60 et U937, la surexpression d'ASCL2 n'induit pas de modifications du niveau d'expression d'ASCL2 en ARNm ou protéique. Enfin, nos données préliminaires de RNAseq nous indiquent que la surexpression

d'ASCL2 ne change pas l'expression de CXCR4 dans les progéniteurs hématopoïétiques CD34+.

Il est cependant envisageable que la régulation de CXCR4 par ASCL2 soit contexte-dépendante. Nous avons montré que l'expression d'ASCL2 dans les progéniteurs CD34+ est faible, il est donc possible que dans ces circonstances ASCL2 ne trouvent pas le partenaire nécessaire à la régulation d'expression de certains gènes cibles dont CXCR4.

Il a été rapporté que la voie de signalisation de CXCR4, le microenvironnement et la voie Wnt induisent l'expression d'ASCL2 dans les cellules gastrointestinales normales. Dans les cellules hématopoïétiques, une régulation d'ASCL2 par CXCR4 n'a pas été testée. Cette question pourrait être abordée par l'analyse de l'expression d'ASCL2 dans les différentes populations hématopoïétiques chez les souris chimériques CXCR4+/+ et CXCR4-/- . Si cette hypothèse était confortée, il serait crucial de réaliser des études visant à définir les voies de signalisation impliquées. Par ailleurs, étant donné le rôle de CXCR4 dans la régulation des ROS, il serait alors intéressant de définir les liens éventuels entre la voie de production des ROS et l'expression d'ASCL2. Dans ce contexte, la surexpression d'ASCL2 observée dans les LAM pourrait contribuer à la régulation de la production des ROS dans ces cellules et au maintien de leurs propriétés à long terme et à leur chimiorésistance.

En conclusion, ce travail de thèse a montré que la voie de signalisation CXCR4/CXCL12 joue un rôle crucial dans le maintien à long terme de l'hématopoïèse normale en régulant la quantité des ROS dans les CSH. Dans l'hématopoïèse leucémique, nous avons montré une expression aberrante d'ASCL2 dont l'inhibition entraîne une perte du potentiel leucémique. Nous proposons donc qu'ASCL2 et CXCR4 sont interconnectés et contribuent ensemble au maintien de l'intégrité des cellules normales et leucémiques de LAM. La poursuite de ces travaux pourrait permettre d'imaginer des stratégies thérapeutiques complémentaires à celles de l'inhibition de l'axe CXCR4, basées sur l'inhibition de la fonction d'ASCL2.

Bibliographie

- Adams, J. M. (2003) 'Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis', *Genes and Development*, 17(20), pp. 2481–2495. doi: 10.1101/gad.1126903.
- Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O. J., Thoren, L. A. M., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M. and Jacobsen, S. E. W. (2005) 'Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: A revised road map for adult blood lineage commitment', *Cell*, 121(2), pp. 295–306. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.013.
- Agger, K., Miyagi, S., Pedersen, M. T., Kooistra, S. M., Johansen, J. V. and Helin, K. (2016) 'Jmjd2/Kdm4 demethylases are required for expression of Il3ra and survival of acute myeloid leukemia cells', *Genes & Development*, 30(11), pp. 1278–1288. doi: 10.1101/gad.280495.116.
- Al-Mawali, A., Gillis, D. and Lewis, I. (2016) 'Immunoprofiling of leukemic stem cells CD34+/CD38-/CD123+ delineate FLT3/ITD-positive clones', *Journal of Hematology & Oncology*. *Journal of Hematology & Oncology*, 9(1), p. 61. doi: 10.1186/s13045-016-0292-z.
- Alcalay, M. and Meani, N. (2003) 'Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair', *Journal of Clinical ...*, 112(11). doi: 10.1172/JCI200317595.Introduction.
- Ambrosi, T. H., Scialdone, A., Graja, A., Gohlke, S., Jank, A.-M., Bocian, C., Woelk, L., Fan, H., Logan, D. W., Schürmann, A., Saraiva, L. R. and Schulz, T. J. (2017) 'Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration', *Cell Stem Cell*, 20(6), p. 771–784.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.02.009.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G. and Humphries, R. K. (2001) 'HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation', *Experimental Hematology*, 29(9), pp. 1125–1134. doi: 10.1016/S0301-472X(01)00681-6.
- Asri, A., Sabour, J., Atashi, A. and Soleimani, M. (2016) 'Homing in hematopoietic stem cells: focus on regulatory role of CXCR7 on SDF1a/CXCR4 axis.', *EXCLI journal*, 15, pp. 134–43. doi: 10.17179/excli2014-585.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y. C., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M. and Bachelier, F. (2005) 'The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), pp. 35760–35766. doi: 10.1074/jbc.M508234200.
- Barzilai, A., Rotman, G. and Shiloh, Y. (2002) 'ATM deficiency and oxidative stress: A new dimension of defective response to DNA damage', *DNA Repair*, 1(1), pp. 3–25. doi: 10.1016/S1568-7864(01)00007-6.
- Basilico, S. and Göttgens, B. (2017) 'Dysregulation of haematopoietic stem cell regulatory programs in acute myeloid leukaemia', *Journal of Molecular Medicine*. *Journal of Molecular Medicine*. doi: 10.1007/s00109-017-1535-3.
- Becker, A. J., McCulloch, E. A. and Till, J. E. (2014) 'Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963. 197:452-454.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(11), pp. 4945–7. doi: 10.1038/197452a0.
- Berman, D. M., Karhadkar, S. S., Maitra, A., Montes de Oca, R., Gerstenblith, M. R., Briggs, K., Parker, A. R., Shimada, Y., Eshleman, J. R., Watkins, D. N. and Beachy, P. A. (2003) 'Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours', *Nature*, 425(6960), pp. 846–851. doi: 10.1038/nature01972.
- Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J. L., Zerneck, A., Koenen, R. R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S. R., Bucala, R., Hickey, M. J. and Weber, C. (2007) 'MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment', *Nature Medicine*, 13(5), pp. 587–596. doi: 10.1038/nm1567.
- Bonnet, D. and Dick, J. E. (1997) 'Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.', *Nature medicine*, 3(7), pp. 730–737. doi: 10.1038/nm0797-730.
- Brown, G., Mooney, C. J., Alberti-Servera, L., Muenchow, L. von, Toellner, K.-M., Ceredig, R. and Rolink, A. (2015) 'Versatility of stem and progenitor cells and the instructive actions of cytokines on hematopoiesis.', *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 52(4), pp. 168–79. doi: 10.3109/10408363.2015.1021412.
- Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M. P., Kunisaki, Y., Scheiermann, C., Schiff, L., Poncz, M., Bergman, A. and Frenette, P. S. (2014) 'Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence

- through CXCL4 secretion', *Nature Medicine*, 20(11), pp. 1315–1320. doi: 10.1038/nm.3707.
- Bryder, D., Rossi, D. J. and Weissman, I. L. (2006) 'Hematopoietic Stem Cells, The Paradigmatic Tissue-Specific Stem Cell', *The American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, Volume 419(2), pp. 149–179. doi: 10.1038/npg.els.0005764.
- Burnett, A. K., Russell, N. H., Hills, R. K., Hunter, A. E., Kjeldsen, L., Yin, J., Gibson, B. E. S., Wheatley, K. and Milligan, D. (2013) 'Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial.', *Journal of clinical oncology*, 31(27), pp. 3360–3368. doi: 10.1200/JCO.2012.47.4874.
- Burns, J. M., Summers, B. C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M. E. T., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Kuo, C. J., Wei, K., McMaster, B. E., Wright, K., Howard, M. C. and Schall, T. J. (2006) 'A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development', *The Journal of Experimental Medicine*, 203(9), pp. 2201–2213. doi: 10.1084/jem.20052144.
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M. and Scadden, D. T. (2003) 'Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche', *Nature*, 425(6960), pp. 841–846. doi: 10.1038/nature02041.1.
- Calvo, J., BenYousef, A., Baijer, J., Rouyez, M.-C. and Pflumio, F. (2012) 'Assessment of human multi-potent hematopoietic stem/progenitor cell potential using a single in vitro screening system.', *PloS one*, 7(11), p. e50495. doi: 10.1371/journal.pone.0050495.
- Lo Celso, C., Fleming, H. E., Wu, J. W., Zhao, C. X., Miake-Lye, S., Fujisaki, J., Côté, D., Rowe, D. W., Lin, C. P. and Scadden, D. T. (2009) 'Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche', *Nature*, 457(7225), pp. 92–96. doi: 10.1038/nature07434.
- Chabanon, A., Desterke, C., Rodenburger, E., Clay, D., Guerton, B., Boutin, L., Bennaceur-Griscelli, A., Pierre-Louis, O., Uzan, G., Abecassis, L., Bourgeade, M.-F., Lataillade, J.-J. and Le Bousse-Kerdilès, M.-C. (2008) 'A cross-talk between stromal cell-derived factor-1 and transforming growth factor-beta controls the quiescence/cycling switch of CD34(+) progenitors through FoxO3 and mammalian target of rapamycin', *Stem cells*, 26(12), pp. 3150–3161. doi: 10.1634/stemcells.2008-0219.
- Chamuleau, M. E. D., Ossenkoppele, G. J., van Rhenen, A., van Dreunen, L., Jirka, S. M. G., Zevenbergen, A., Schuurhuis, G. J. and van de Loosdrecht, A. A. (2011) 'High TRAIL-R3 expression on leukemic blasts is associated with poor outcome and induces apoptosis-resistance which can be overcome by targeting TRAIL-R2', *Leukemia Research*. Elsevier Ltd, 35(6), pp. 741–749. doi: 10.1016/j.leukres.2010.12.032.
- Chen, Y., Jacamo, R., Konopleva, M., Garzon, R., Croce, C. and Andreeff, M. (2013) 'CXCR4 downregulation of let-7a drives chemoresistance in acute myeloid leukemia', *Journal of Clinical Investigation*, 123(6), pp. 2395–2407. doi: 10.1172/JCI66553.
- Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Mendez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., van Rooijen, N., Tanaka, M., Merad, M., Frenette, P. S. and Méndez-Ferrer, S. (2011) 'Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche.', *The Journal of experimental medicine*, 208(2), pp. 261–71. doi: 10.1084/jem.20101688.
- Chumsri, S., Matsui, W. and Burger, A. M. (2007) 'Therapeutic implications of leukemic stem cell pathways', *Clinical Cancer Research*, 13(22), pp. 6549–6554. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1088.
- Civin, B. C. I., Trischmann, T., Kadan, N. S., Davis, J., Noga, S., Cohen, K., Duffy, B., Groenewegen, I., Wiley, J., Law, P., Hardwick, A., Oldham, F. and Gee, A. (1996) 'Highly Purified CD34-Positive Cells Reconstitute Hematopoiesis', *J Clin Oncol*, 14(8), pp. 2224–2233.
- COHEN, G. and HOCHSTEIN, P. (1963) 'GLUTATHIONE PEROXIDASE: THE PRIMARY AGENT FOR THE ELIMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE IN ERYTHROCYTES.', *Biochemistry*, 2(6), pp. 1420–8. doi: 10.1021/bi00906a038.
- Colin, Y., Joulin, V., Le Van Kim, C., Romeo, P. H. and Cartron, J. P. (1990) 'Characterization of a new erythroid/megakaryocyte-specific nuclear factor that binds the promoter of the housekeeping human glycophorin C gene', *Journal of Biological Chemistry*, 265(28), pp. 16729–16732.
- Conway, K., Edmiston, S. N., May, R., Kuan, P. F., Chu, H., Bryant, C., Tse, C.-K., Swift-Scanlan, T., Geradts, J., Troester, M. A. and Millikan, R. C. (2014) 'DNA methylation profiling in the Carolina Breast Cancer Study defines cancer subclasses differing in clinicopathologic characteristics and survival.', *Breast cancer research : BCR*, 16(5), p. 450. doi: 10.1186/s13058-014-0450-6.
- Correia, N. C., Arcangeli, M.-L., Pflumio, F. and Barata, J. T. (2016) 'Stem Cell Leukemia: how a TALEnted actor can go awry on the hematopoietic stage.', *Leukemia*, (May), pp. 1968–1978. doi: 10.1038/leu.2016.169.
- Costa, G., Kouskoff, V. and Lacaud, G. (2012) 'Origin of blood cells and HSC production in the embryo',

- Trends in Immunology*. Elsevier Ltd, 33(5), pp. 215–223. doi: 10.1016/j.it.2012.01.012.
- Craig, B. W., Kay, R., Cutler, R. L. and Lansdorp, P. M. (1993) 'Expression of Thy-1 on Human Hematopoietic Progenitor Cells', *J exp Med*, 177(May).
- Czechowicz, A., Kraft, D., Weissman, I. L. and Bhattacharya, D. (2007) 'Efficient Transplantation via Antibody-Based Clearance of Hematopoietic Stem Cell Niches', *Science*, 318(5854), pp. 1296–1299. doi: 10.1126/science.1149726.
- D'Autréaux, B. and Toledano, M. B. (2007) 'ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), pp. 813–824. doi: 10.1038/nrm2256.
- Décaillot, F. M., Kazmi, M. A., Lin, Y., Ray-Saha, S., Sakmar, T. P. and Sachdev, P. (2011) 'CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits β -arrestin to enhance cell migration', *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), pp. 32188–32197. doi: 10.1074/jbc.M111.277038.
- Demetri, G. D. and Griffin, J. D. (1991) 'Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor.', *Blood*, 78(11), pp. 2791–808. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1720034>.
- Desbourdes, L., Javary, J., Charbonnier, T., Ishac, N., Bourgeais, J., Iltis, A., Chomel, J.-C., Turhan, A., Guilloton, F., Tarte, K., Demattei, M.-V., Ducrocq, E., Rouleux-Bonnin, F., Gyan, E., Hérault, O. and Domenech, J. (2017) 'Alteration Analysis of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells from De Novo Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis', *Stem Cells and Development*, 0(0), p. scd.2016.0295. doi: 10.1089/scd.2016.0295.
- Dessein, A. F., Stechly, L., Jonckheere, N., Dumont, P., Monté, D., Leteurtre, E., Truant, S., Pruvot, F. R., Figeac, M., Hebbar, M., Lecellier, C. H., Lesuffleur, T., Dessein, R., Grard, G., Dejonghe, M. J., De Launoit, Y., Furuichi, Y., Prévost, G., Porchet, N., Gespach, C. and Huet, G. (2010) 'Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells', *Cancer Research*, 70(11), pp. 4644–4654. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3828.
- DeVilbiss, A. W., Tanimura, N., McIver, S. C., Katsumura, K. R., Johnson, K. D. and Bresnick, E. H. (2016) *Navigating Transcriptional Coregulator Ensembles to Establish Genetic Networks: A GATA Factor Perspective*. 1st edn, *Current Topics in Developmental Biology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.01.003.
- Dexter, T. M., Allen, T. D. and Lajtha, L. G. (1977) 'Conditions controlling the proliferation of hemopoietic stem cells in vitro', *J.Cell.Physiol.*, 91, pp. 335–344. doi: 10.1002/jcp.1040910303.
- Ding, Y., Gao, H. and Zhang, Q. (2017) 'The biomarkers of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia', *Stem Cell Investigation*, 4(3), pp. 19–19. doi: 10.21037/sci.2017.02.10.
- Du, C., Redner, R. L., Cooke, M. P. and Lavau, C. (1999) 'Overexpression of wild-type retinoic acid receptor alpha (RARalpha) recapitulates retinoic acid-sensitive transformation of primary myeloid progenitors by acute promyelocytic leukemia RARalpha-fusion genes.', *Blood*, 94(2), pp. 793–802.
- Duchartre, Y., Kim, Y. M. and Kahn, M. (2016) 'The Wnt signaling pathway in cancer', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd, 99, pp. 141–149. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.12.005.
- Eaves, C. (2015) 'Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality', *Blood*, 125(17), pp. 2605–2614. doi: 10.1182/blood-2014-12-570200.Lessons.
- Edward Allan R Sison and Patrick Brown (2011) 'The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting', *Expert Rev Hematol*, 4(3), pp. 271–283. doi: 10.1586/ehm.11.30.
- Ehninger, A. and Trumpp, A. (2011) 'The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in.', *The Journal of experimental medicine*, 208(3), pp. 421–8. doi: 10.1084/jem.20110132.
- Essers, M. A. G. and Trumpp, A. (2010) 'Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy', *Molecular Oncology*. Elsevier B.V, 4(5), pp. 443–450. doi: 10.1016/j.molonc.2010.06.001.
- Fiegl, M., Samudio, I., Clise-dwyer, K., Burks, J. K., Mnjoyan, Z. and Andreeff, M. (2009) 'CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure', *Culture*, 113(7), pp. 1504–1512. doi: 10.1182/blood-2008-06-161539.
- Fleming, H. E., Janzen, V., Lo Celso, C., Guo, J., Leahy, K. M., Kronenberg, H. M. and Scadden, D. T. (2008) 'Wnt Signaling in the Niche Enforces Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Is Necessary to Preserve Self-Renewal In Vivo', *Cell Stem Cell*, 2(3), pp. 274–283. doi: 10.1016/j.stem.2008.01.003.
- van der Flier, L. G., van Gijn, M. E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegbarth, A., Stange, D. E., Begthel, H., van den Born, M., Guryev, V., Oving, I., van Es, J. H., Barker, N., Peters, P. J., van de Wetering, M. and Clevers, H. (2009) 'Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate', *Cell*. Elsevier Ltd, 136(5), pp. 903–912. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.031.
- Foudi, A., Jarrier, P., Zhang, Y., Wittner, M., Geay, J. F., Lecluse, Y., Nagasawa, T., Vainchenker, W. and Louache, F. (2006) 'Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4-/- chimeric mice', *Blood*, 107, pp. 2243–2251. doi: 10.1182/blood-2005-

02-0581.

- Furukawa, Y. (2005) 'Methylation Silencing of the Apaf-1 Gene in Acute Leukemia', *Molecular Cancer Research*, 3(6), pp. 325–334. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-04-0105.
- Giakountis, A., Moulos, P., Zarkou, V., Oikonomou, C., Harokopos, V., Hatzigeorgiou, A. G., Reczko, M. and Hatzis, P. (2016) 'A Positive Regulatory Loop between a Wnt-Regulated Non-coding RNA and ASCL2 Controls Intestinal Stem Cell Fate', *Cell Reports*. The Author(s), 15(12), pp. 2588–2596. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.038.
- Gilliland, D. G. and Griffin, J. D. (2002) 'The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia.', *Blood*, 100(5), pp. 1532–42. doi: 10.1182/blood-2002-02-0492.
- Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S., Marcaccio, M., Pinton, P., Rizzuto, R., Bernardi, P., Paolucci, F. and Pelicci, P. G. (2005) 'Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis', *Cell*, 122(2), pp. 221–233. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.011.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C. and Niehrs, C. (1998) 'Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction.', *Nature*, 391(6665), pp. 357–62. doi: 10.1038/34848.
- Gong, J. K. (1978) 'Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells.', *Science (New York, N.Y.)*, 199(4336), pp. 1443–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/75570>.
- Goodell, B. M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S. and Mulligan, R. C. (1996) 'Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells that are Replicating In Vivo', *J exp Med*, 183(April).
- Grigg, a P., Roberts, a W., Raunow, H., Houghton, S., Layton, J. E., Boyd, a W., McGrath, K. M. and Maher, D. (1995) 'Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers.', *Blood*, 86(12), pp. 4437–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8541532>.
- Gross, S., Cairns, R. A., Minden, M. D., Driggers, E. M., Bittinger, M. A., Jang, H. G., Sasaki, M., Jin, S., Schenkein, D. P., Su, S. M., Dang, L., Fantin, V. R. and Mak, T. W. (2010) 'Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations', *The Journal of Experimental Medicine*, 207(2), pp. 339–344. doi: 10.1084/jem.20092506.
- Grossmann, V., Schnittger, S., Kohlmann, A., Eder, C., Roller, A., Dicker, F., Schmid, C., Wendtner, C. M., Staib, P., Serve, H., Kreuzer, K. A., Kern, W., Haferlach, T. and Haferlach, C. (2012) 'A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations', *Blood*, 120(15), pp. 2963–2972. doi: 10.1182/blood-2012-03-419622.
- Hashimshony, T., Wagner, F., Sher, N. and Yanai, I. (2012) 'CEL-Seq: Single-Cell RNA-Seq by Multiplexed Linear Amplification', *Cell Reports*. The Authors, 2(3), pp. 666–673. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.003.
- Herault, O., Hope, K. J., Deneault, E., Mayotte, N., Chagraoui, J., Wilhelm, B. T., Cellot, S., Sauvageau, M., Andrade-Navarro, M. A., Hébert, J. and Sauvageau, G. (2012) 'A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 209(5), pp. 895–901. doi: 10.1084/jem.20102386.
- Herbst, A., Jurinovic, V., Krebs, S., Thieme, S. E., Blum, H., Göke, B. and Kolligs, F. T. (2014) 'Comprehensive analysis of β -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ β -catenin signaling', *BMC Genomics*, 15(1), p. 74. doi: 10.1186/1471-2164-15-74.
- Hess, J. L. (2004) 'MLL: A histone methyltransferase disrupted in leukemia', *Trends in Molecular Medicine*, 10(10), pp. 500–507. doi: 10.1016/j.molmed.2004.08.005.
- Hirschi, K. K., Nicoli, S. and Walsh, K. (2017) 'Hematopoiesis Lineage Tree Uprooted: Every Cell Is a Rainbow', *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 41(1), pp. 7–9. doi: 10.1016/j.devcel.2017.03.020.
- Ho, M. S. H., Medcalf, R. L., Livesey, S. A. and Traianedes, K. (2015) 'The dynamics of adult haematopoiesis in the bone and bone marrow environment', *British Journal of Haematology*, 170(4), pp. 472–486. doi: 10.1111/bjh.13445.
- Hoang, T., Lambert, J. A. and Martin, R. (2016) *SCL/TAL1 in Hematopoiesis and Cellular Reprogramming*. 1st edn, *Hematopoiesis*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.01.004.
- Hofmann, B., Hecht, H. and Flohé, L. (2002) 'Peroxiredoxins.', *Biological chemistry*, 383(3–4), pp. 347–64. doi: 10.1515/BC.2002.040.
- Hosokawa, J., Suzuki, K., Meguro, K., Tanaka, S., Maezawa, Y., Suto, A., Fujimura, L., Sakamoto, A., Clevers, H., Ohara, O. and Nakajima, H. (2016) 'I κ BNS enhances T follicular helper cell differentiation and function as downstream of Ascl2', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Ltd, (2017). doi: 10.1016/j.jaci.2016.10.047.
- Hu, R., Xu, C., Shen, G., Jain, M. R., Khor, T. O., Gopalkrishnan, A., Lin, W., Reddy, B., Chan, J. Y. and Kong, A. N. T. (2006) 'Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice', *Cancer Letters*, 243(2), pp. 170–192. doi:

- 10.1016/j.canlet.2005.11.050.
- Hu, X., Chen, L., Wang, Q., Zhao, X., Tan, J., Cui, Y., Liu, X., Zhang, X. and Bian, X. (2015) 'Elevated expression of ASCL2 is an independent prognostic indicator in lung squamous cell carcinoma', *Journal of Clinical Pathology*, p. jclinpath-2015-203025. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203025.
- Iiyama, M., Kakihana, K., Kurosu, T. and Miura, O. (2006) 'Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression', *Cellular Signalling*, 18(2), pp. 174–182. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.04.002.
- Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., Nakamura, R., Tanaka, T., Tomiyama, H., Saito, N., Fukata, M., Miyamoto, T., Lyons, B., Ohshima, K., Uchida, N., Taniguchi, S., Ohara, O., Akashi, K., Harada, M. and Shultz, L. D. (2007) 'Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region.', *Nature biotechnology*, 25(11), pp. 1315–1321. doi: 10.1038/nbt1350.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., Ikeda, Y., Mak, T. W. and Suda, T. (2004) 'Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells', *Nature*, 431(7011), pp. 997–1002. doi: 10.1038/nature02989.
- Jang, Y. and Sharkis, S. J. (2007) 'STEM CELLS IN HEMATOLOGY A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche', *October*, 110(8), pp. 3056–3063. doi: 10.1182/blood-2007-05-087759.An.
- Jin, L., Hope, K. J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F. and Dick, J. E. (2006) 'Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells', *Nature Medicine*, 12(10), pp. 1167–1174. doi: nm1483 [pii]; 10.1038/nm1483 [doi].
- Jones, S. (2004) 'An overview of the basic helix-loop-helix proteins.', *Genome Biology*, 5(6), p. 226. doi: 10.1186/gb-2004-5-6-226.
- Jubb, a M., Chalasani, S., Frantz, G. D., Smits, R., Grabsch, H. I., Kavi, V., Maughan, N. J., Hillan, K. J., Quirke, P. and Koeppen, H. (2006) 'Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia.', *Oncogene*, 25(24), pp. 3445–57. doi: 10.1038/sj.onc.1209382.
- Kabiri, Z., Numata, A., Kawasaki, A., Tenen, D. G. and Virshup, D. M. (2015) 'Wnts are dispensable for differentiation and self-renewal of adult murine hematopoietic stem cells', 126(9), pp. 1–14. doi: 10.1182/blood-2014-09-598540.A.N.
- Karhadkar, S. S., Steven Bova, G., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J. T., Berman, D. M. and Beachy, P. A. (2004) 'Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis', *Nature*, 431(7009), pp. 707–712. doi: 10.1038/nature02962.
- Kent, D. G., Copley, M. R., Benz, C., Wöhler, S., Dykstra, B. J., Ma, E., Zhao, Y., Bowie, M. B., Zhao, Y., Gasparetto, M., Delaney, A., Marra, M., Eaves, C. J., Dc, W., Kent, D. G., Copley, M. R., Benz, C., Wo, S., Dykstra, B. J., Ma, E., Cheyne, J., Zhao, Y., Bowie, M. B., Zhao, Y., Gasparetto, M., Delaney, A., Smith, C., Marra, M. and Eaves, C. J. (2009) 'Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential', *Blood*, 113(25), pp. 6342–6350. doi: 10.1182/blood-2008-12-192054.
- Kiel, M. J., Acar, M., Radice, G. L. and Morrison, S. J. (2009) 'Hematopoietic Stem Cells Do Not Depend on N-Cadherin to Regulate Their Maintenance', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 4(2), pp. 170–179. doi: 10.1016/j.stem.2008.10.005.
- Kiel, M. J., Radice, G. L. and Morrison, S. J. (2007) 'Lack of Evidence that Hematopoietic Stem Cells Depend on N-Cadherin-Mediated Adhesion to Osteoblasts for Their Maintenance', *Cell Stem Cell*, 1(2), pp. 204–217. doi: 10.1016/j.stem.2007.06.001.
- Kiel, M. J., Yilmaz, Ö. H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C. and Morrison, S. J. (2005) 'SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells', *Cell*, 121(7), pp. 1109–1121. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.026.
- Klampfer, L., Zhang, J., Zelenetz, A. O., Uchida, H. and Nimer, S. D. (1996) 'The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), pp. 14059–64. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19494&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Klebanoff, S. J. (2005) 'Myeloperoxidase: friend and foe', *Journal of Leukocyte Biology*, 77(5), pp. 598–625. doi: 10.1189/jlb.1204697.
- Kobune, M., Takimoto, R., Murase, K., Iyama, S., Sato, T., Kikuchi, S., Kawano, Y., Miyanishi, K., Sato, Y., Niitsu, Y. and Kato, J. (2009) 'Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells', *Cancer Science*, 100(5), pp. 948–955. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01111.x.
- Koef, H. P. and Leong, G. (2017) 'Preleukemia : one name , many meanings', (May 2016), pp. 1–9. doi:

- 10.1038/leu.2016.364.
- Kollet, O., Canaani, J., Kalinkovich, A. and Lapidot, T. (2012) 'Regulatory cross talks of bone cells, hematopoietic stem cells and the nervous system maintain hematopoiesis.', *Inflammation & allergy drug targets*, 11(3), pp. 170–80. doi: IADT-EPUB-20120120-012 [pii].
- Kollet, O., Dar, A., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Lapid, K., Sztainberg, Y., Tesio, M., Samstein, R. M., Goichberg, P., Spiegel, A., Elson, A. and Lapidot, T. (2006) 'Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells.', *Nature medicine*, 12(6), pp. 657–64. doi: 10.1038/nm1417.
- Konopleva, M., Tabe, Y., Zeng, Z. and Andreeff, M. (2009) 'Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: Mechanisms and approaches', *Drug Resistance Updates*, 12(4–5), pp. 103–113. doi: 10.1016/j.drug.2009.06.001.
- Krause, D. S. and Van Etten, R. A. (2007) 'Right on target: eradicating leukemic stem cells', *Trends in Molecular Medicine*, 13(11), pp. 470–481. doi: 10.1016/j.molmed.2007.09.003.
- Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., Sarkadi, B., Sorrentino, B. P. and Schuetz, J. D. (2004) 'The Stem Cell Marker Bcrp/ABCG2 Enhances Hypoxic Cell Survival through Interactions with Heme', *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), pp. 24218–24225. doi: 10.1074/jbc.M313599200.
- Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., Mizoguchi, T., Wei, Q., Lucas, D., Ito, K., Mar, J. C., Bergman, A. and Frenette, P. S. (2013) 'Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence', *Nature*. Nature Publishing Group, 502(7473), pp. 637–643. doi: 10.1038/nature12612.
- Kury, P., Greiner-Petter, R., Cornely, C., Jurgens, T. and Muller, H. W. (2002) 'Mammalian achaete scute homolog 2 is expressed in the adult sciatic nerve and regulates the expression of Krox24, Mob-1, CXCR4, and p57kip2 in Schwann cells', *J Neurosci*, 22(17), pp. 7586–7595. doi: 22/17/7586 [pii].
- Kwon, O. H., Park, J. L., Baek, S. J., Noh, S. M., Song, K. S., Kim, S. Y. and Kim, Y. S. (2013) 'Aberrant upregulation of ASCL2 by promoter demethylation promotes the growth and resistance to 5-fluorouracil of gastric cancer cells', *Cancer Science*, 104(3), pp. 391–397. doi: 10.1111/cas.12076.
- Lacaud, G. and Kouskoff, V. (2016) 'Of hemangioblast, hemogenic endothelium and primitive versus definitive hematopoiesis', *Experimental Hematology*. ISEH - International Society for Experimental Hematology. doi: 10.1016/j.exphem.2016.12.009.
- 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., Liesveld, J. L., Brookes, P. S., Becker, M. W. and Jordan, C. T. (2013) 'BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells', *Cell Stem Cell*, 12(3), pp. 329–341. doi: 10.1016/j.stem.2012.12.013.
- Lane, S. W., Scadden, D. T. and Gilliland, D. G. (2009) 'The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities', *Blood*, 114(6), p. 1150. doi: 10.1182/blood-2009-01-202606.
- Lapidot, T., Dar, A. and Kollet, O. (2005) 'How do stem cells find their way home?', *Blood*, 106(6), pp. 1901–1910. doi: 10.1182/blood-2005-04-1417.T.L.
- Laurenti, E., Varnum-Finney, B., Wilson, A., Ferrero, I., Blanco-Bose, W. E., Ehninger, A., Knoepfler, P. S., Cheng, P., MacDonald, H. R., Eisenman, R. N., Bernstein, I. D. and Trumpp, A. (2008) 'Hematopoietic Stem Cell Function and Survival Depend on c-Myc and N-Myc Activity', *Cell Stem Cell*, 3(6), pp. 611–624. doi: 10.1016/j.stem.2008.09.005.
- Lawal, R. A., Zhou, X., Batey, K., Hoffman, C. M., Georger, M. A., Radtke, F., Hilton, M. J., Xing, L., Frisch, B. J. and Calvi, L. M. (2017) 'The Notch Ligand Jagged1 Regulates the Osteoblastic Lineage by Maintaining the Osteoprogenitor Pool', *Journal of Bone and Mineral Research*, xx(xx), pp. 1–12. doi: 10.1002/jbmr.3106.
- Lazarus, H. M., Koc, O. N., Devine, S. M., Curtin, P., Maziarz, R. T., Holland, H. K., Shpall, E. J., McCarthy, P., Atkinson, K., Cooper, B. W., Gerson, S. L., Laughlin, M. J., Loberiza, F. R., Moseley, A. B. and Bacigalupo, A. (2005) 'Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 11(5), pp. 389–398. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.02.001.
- Ledent, V., Paquet, O. and Vervoort, M. (2002) 'Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins', *Genome Biology*, 3(6), pp. 30–1. doi: 10.1101/gr.177001.1.
- Lee, H. R., Cho, J. M., Shin, D. H., Yong, C. S., Choi, H. G., Wakabayashi, N. and Kwak, M. K. (2008) 'Adaptive response to GSH depletion and resistance to L-buthionine-(S,R)-sulfoximine: Involvement of Nrf2 activation', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 318(1–2), pp. 23–31. doi: 10.1007/s11010-008-9853-y.
- Lee, J. Y., Nakada, D., Yilmaz, O. H., Tothova, Z., Joseph, N. M., Lim, M. S., Gilliland, D. G. and Morrison, S. J. (2010) 'MTOR activation induces tumor suppressors that inhibit leukemogenesis and deplete

- hematopoietic stem cells after pten deletion', *Cell Stem Cell*, 7(5), pp. 593–605. doi: 10.1016/j.stem.2010.09.015.
- Levoe, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F. and Lagane, B. (2009) 'CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling', *Blood*, 113(24), pp. 6085–6093. doi: 10.1182/blood-2008-12-196618.
- Li, L., Baxter, S. S., Gu, N., Ji, M. and Zhan, X. (2017) 'Missing-in-metastasis protein downregulates CXCR4 by promoting ubiquitylation and interaction with small Rab GTPases', *Journal of Cell Science*, 130(8), pp. 1475–1485. doi: 10.1242/jcs.198937.
- Li, W., Nishimura, R., Kashishian, A., Batzer, A. G., Kim, W. J., Cooper, J. A. and Schlessinger, J. (1994) 'A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase.', *Molecular and cellular biology*, 14(1), pp. 509–17. doi: 10.1128/MCB.14.1.509.Updated.
- Lichterfeld, M., Martin, S., Burkly, L., Haas, R. and Kronenwett, R. (2000) 'Mobilization of CD34+ haematopoietic stem cells is associated with a functional inactivation of the integrin very late antigen 4', *British Journal of Haematology*, 110(1), pp. 71–81. doi: 10.1046/j.1365-2141.2000.02130.x.
- Lim, Y., Gondek, L., Li, L., Wang, Q., Ma, H., Chang, E., Huso, D. L., Foerster, S., Marchionni, L., McGovern, K., Watkins, D. N., Peacock, C. D., Levis, M., Smith, B. D., Merchant, A. A., Small, D. and Matsui, W. (2015) 'Integration of Hedgehog and mutant FLT3 signaling in myeloid leukemia', *Science Translational Medicine*, 7(291), p. 291ra96-291ra96. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa5731.
- Liu, X., Chen, X., Zhong, B., Wang, A., Wang, X., Chu, F., Nurieva, R. I., Yan, X., Chen, P., van der Flier, L. G., Nakatsukasa, H., Neelapu, S. S., Chen, W., Clevers, H., Tian, Q., Qi, H., Wei, L., Dong, C. and Flier, L. G. Van Der (2014) 'Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development', *Nature*. Nature Publishing Group, 507(7493), pp. 513–518. doi: 10.1038/nature12910.
- Luis, T. C., Ichii, M., Brugman, M. H., Kincade, P. and Staal, F. J. T. (2012) 'Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development', *Leukemia*. Nature Publishing Group, 26(3), pp. 414–421. doi: 10.1038/leu.2011.387.
- Lunghi, P., Tabilio, a, Dall'Aglio, P. P., Ridolo, E., Carlo-Stella, C., Pelicci, P. G. and Bonati, a (2003) 'Downmodulation of ERK activity inhibits the proliferation and induces the apoptosis of primary acute myelogenous leukemia blasts', *Leukemia*, 17, pp. 1783–1793. doi: 10.1038/sj.leu.2403032.
- Lutterbach, B., Westendorf, J. J., Linggi, B., Patten, A., Moniwa, M., Davie, J. R., Huynh, K. D., Bardwell, V. J., Lavinsky, R. M., Rosenfeld, M. G., Glass, C., Seto, E. and Hiebert, S. W. (1998) 'ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors.', *Molecular and cellular biology*, 18(12), pp. 7176–84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lyman, S. D., James, L., Bos, T. V., De Vries, P., Brasel, K., Gliniak, B., Hollingsworth, L. T., Picha, K. S., McKenna, H. J., Splett, R. R., Fletcher, F. a., Maraskovsky, E., Farrah, T., Foxworthe, D., Williams, D. E. and Beckmann, M. P. (1993) 'Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: A proliferative factor for primitive hematopoietic cells', *Cell*, 75(6), pp. 1157–1167. doi: 10.1016/0092-8674(93)90325-K.
- Mantel, C., Messina-Graham, S. and Broxmeyer, H. E. (2010) 'Upregulation of nascent mitochondrial biogenesis in mouse hematopoietic stem cells parallels upregulation of CD34 and loss of pluripotency: A potential strategy for reducing oxidative risk in stem cells', *Cell Cycle*, 9(10), pp. 2008–2017. doi: 10.4161/cc.9.10.11733.
- Mantel, C., Messina-Graham, S., Moh, A., Cooper, S., Hangoc, G., Fu, X.-Y. and Broxmeyer, H. E. (2012) 'defects , mitochondrial dysfunction , ROS overproduction , and a rapid Mouse hematopoietic cell – targeted STAT3 deletion : stem / progenitor cell defects , mitochondrial dysfunction , ROS overproduction , and a rapid aging – like phenotype', *Blood*, 120(13), pp. 2589–2599. doi: 10.1182/blood-2012-01-404004.
- Mantel, C. R., O'Leary, H. A., Chitteti, B. R., Huang, X., Cooper, S., Hangoc, G., Brustovetsky, N., Srour, E. F., Lee, M. R., Messina-Graham, S., Haas, D. M., Falah, N., Kapur, R., Pelus, L. M., Bardeesy, N., Fitamant, J., Ivan, M., Kim, K. and Broxmeyer, H. E. (2015) 'Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock', *Cell*, 161(7), pp. 1553–1565. doi: 10.1016/j.cell.2015.04.054.
- Mendelson, A. and Frenette, P. S. (2014) 'Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration', *Nature medicine*, 20(8), pp. 833–846. doi: 10.1038/nm.3647.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., MacArthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N. and Frenette, P. S. (2010) 'Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche', *Nature*, 466(7308), pp. 829–834. doi: 10.1038/nature09262.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. and Remacle, J. (1994) 'Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress', *Free Radical Biology and Medicine*,

- 17(3), pp. 235–248. doi: 10.1016/0891-5849(94)90079-5.
- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P. P., Lanfrancone, L. and Pelicci, P. G. (1999) 'The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals', *Nature*, 402(6759), pp. 309–313. doi: 10.1038/46311.
- Mikkola, H. K. A. and Orkin, S. H. (2006) 'The journey of developing hematopoietic stem cells', 3744, pp. 3733–3744. doi: 10.1242/dev.02568.
- Milsom, M. D., Schiedmeier, B., Bailey, J., Kim, M.-O., Li, D., Jansen, M., Ali, A. M., Kirby, M., Baum, C., Fairbairn, L. J. and Williams, D. A. (2009) 'Ectopic HOXB4 overcomes the inhibitory effect of tumor necrosis factor- α on Fanconi anemia hematopoietic stem and progenitor cells.', *Blood*, 113(21), pp. 5111–5120. doi: 10.1182/blood-2008-09-180224.
- Miyamoto, K., Araki, K. Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Harada, M., Motoyama, N., Suda, T. and Hirao, A. (2007) 'Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool', *Cell Stem Cell*, 1(1), pp. 101–112. doi: 10.1016/j.stem.2007.02.001.
- Miyamoto, K., Miyamoto, T., Kato, R., Yoshimura, A., Motoyama, N. and Suda, T. (2008) 'FoxO3a regulates hematopoietic homeostasis through a negative feedback pathway in conditions of stress or aging', *Blood*, 112(12), pp. 4485–4493. doi: 10.1182/blood-2008-05-159848.
- Miyamoto, T., Hasuike, S., Jinno, Y., Soejima, H., Yun, K., Miura, K., Ishikawa, M. and Niikawa, N. (2002) 'The human ASCL2 gene escaping genomic imprinting and its expression pattern', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 19(5), pp. 240–244. doi: 10.1023/A:1015362903486.
- Mohr, A., Zwacka, R. M., Jarmy, G., Bünker, C., Schrezenmeier, H., Döhner, K., Beltinger, C., Wiesneth, M., Debatin, K.-M. and Stahnke, K. (2005) 'Caspase-8L expression protects CD34+ hematopoietic progenitor cells and leukemic cells from CD95-mediated apoptosis.', *Oncogene*, 24(14), pp. 2421–9. doi: 10.1038/sj.onc.1208432.
- Morita, Y., Ema, H. and Nakauchi, H. (2010) 'Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment', *Journal of experimental biology*, 207(6). doi: 10.1084/jem.20091318.
- Morrison, S. J. and Weissman, I. L. (1994) 'The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype', *Immunity*, 1(8), pp. 661–673. doi: 10.1016/1074-7613(94)90037-X.
- Murati, A., Brecqueville, M., Devillier, R., Mozziconacci, M.-J., Gelsi-Boyer, V. and Birnbaum, D. (2012) 'Myeloid malignancies: mutations, models and management', *BMC Cancer*. ???, 12(1), p. 304. doi: 10.1186/1471-2407-12-304.
- Murre, C., Bain, G., van Dijk, M. A., Engel, I., Furnari, B. A., Massari, M. E., Matthews, J. R., Quong, M. W., Rivera, R. R. and Stuver, M. H. (1994) 'Structure and function of helix-loop-helix proteins', *BBA - Gene Structure and Expression*, 1218(2), pp. 129–135. doi: 10.1016/0167-4781(94)90001-9.
- Nagasawa, T. (2014) 'CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4', *Journal of Molecular Medicine*, 92(5), pp. 433–439. doi: 10.1007/s00109-014-1123-8.
- Nakamura-Ishizu, A., Takubo, K., Kobayashi, H., Suzuki-Inoue, K. and Suda, T. (2015) 'CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow', *The Journal of Experimental Medicine*, 212(12), pp. 2133–2146. doi: 10.1084/jem.20150057.
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P. L., Hauschka, P. V., Fahey, F. and Daley, G. Q. (2009) 'Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment.', *Nature*. Nature Publishing Group, 460(7252), pp. 259–63. doi: 10.1038/nature08099.
- Nervi, B., Link, D. C. and DiPersio, J. F. (2006) 'Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization', *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(3), pp. 690–705. doi: 10.1002/jcb.21043.
- Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J. D. (2003) 'Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence.', *The Biochemical journal*, 374(Pt 2), pp. 337–48. doi: 10.1042/BJ20030754.
- Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poeppl, A., Jurisica, I. and Dick, J. E. (2011) 'Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment', *Science*, 333(6039), pp. 218–221. doi: 10.1126/science.1201219.
- Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O. I., Wilson, G., Kaufmann, K. B., McLeod, J., Laurenti, E., Dunant, C. F., McPherson, J. D., Stein, L. D., Dror, Y. and Dick, J. E. (2016) 'Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny', *Science*, 351(6269), p. aab2116-aab2116. doi: 10.1126/science.aab2116.
- Novak, J. P. and Stewart, C. C. (1991) 'Stochastic versus deterministic in haemopoiesis : what is what?', *British Journal of Haematology*, 78, pp. 149–154.

- Ohlsson, E., Schuster, M. B., Hasemann, M. and Porse, B. T. (2015) 'The multifaceted functions of C/EBP α in normal and malignant hematopoiesis', *Leukemia*. Nature Publishing Group, 30(August), pp. 1–33. doi: 10.1038/leu.2015.324.
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G. and Downing, J. R. (1996) 'AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis.', *Cell*, 84(2), pp. 321–30. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80986-1.
- Orkin, S. H. and Zon, L. I. (2008) 'Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology', *Cell*, 132(4), pp. 631–644. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.025.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. and Nakauchi, H. (1996) 'Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell.', *Science (New York, N.Y.)*, 273(5272), pp. 242–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8662508>.
- Pan, L., Chen, S., Weng, C., Call, G., Zhu, D., Tang, H., Zhang, N. and Xie, T. (2007) 'Stem Cell Aging Is Controlled Both Intrinsically and Extrinsically in the Drosophila Ovary', *Cell Stem Cell*, 1(4), pp. 458–469. doi: 10.1016/j.stem.2007.09.010.
- Park, I., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., Morrison, S. J. and Clarke, M. F. (2003) 'Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells', *Nature*, 423(6937), pp. 302–305. doi: 10.1038/nature01587.
- Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.-A., Sackstein, R. and Down, J. D. (2007) 'Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), pp. 5431–5436. doi: 10.1073/pnas.0701152104.
- Passegué, E., Wagers, A. J., Giuriato, S., Anderson, W. C. and Weissman, I. L. (2005) 'Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates', *The Journal of Experimental Medicine*, 202(11), pp. 1599–1611. doi: 10.1084/jem.20050967.
- Patel, J. P., Gönen, M., Figueroa, M. E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., Van Vlierberghe, P., Dolgalev, I., Thomas, S., Aminova, O., Huberman, K., Cheng, J., Viale, A., Socci, N. D., Heguy, A., Cherry, A., Vance, G., Higgins, R. R., Ketterling, R. P., Gallagher, R. E., Litzow, M., van den Brink, M. R. M., Lazarus, H. M., Rowe, J. M., Luger, S., Ferrando, A., Paietta, E., Tallman, M. S., Melnick, A., Abdel-Wahab, O. and Levine, R. L. (2012) 'Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia', *New England Journal of Medicine*, 366(12), pp. 1079–1089. doi: 10.1056/NEJMoa1112304.
- Paul, F., Arkin, Y., Giladi, A., Jaitin, D. A., Kenigsberg, E., Keren-Shaul, H., Winter, D., Lara-Astiaso, D., Gury, M., Weiner, A., David, E., Cohen, N., Lauridsen, F. K. B., Haas, S., Schlitzer, A., Mildner, A., Ginhoux, F., Jung, S., Trumpp, A., Porse, B. T., Tanay, A. and Amit, I. (2015) 'Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors', *Cell*. Elsevier Inc., 163(7), pp. 1663–1677. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.013.
- Pearce, D. J., Taussig, D., Simpson, C., Allen, K., Rohatiner, A. Z., Lister, T. A. and Bonnet, D. (2005) 'Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples.', *Stem cells*, 23, pp. 752–760. doi: 10.1634/stemcells.2004-0292.
- Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Petit, I., Ben-Hur, H., Lapidot, T. and Alon, R. (1999) 'The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow', *J Clin Invest*, 104(9), pp. 1199–1211.
- Peled, A. and Tavor, S. (2013) 'Role of CXCR4 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia', *Theranostics*, 3(1), pp. 34–39. doi: 10.7150/thno.5150.
- Perié, L. and Duffy, K. R. (2016) 'Retracing the in vivo haematopoietic tree using single-cell methods', *FEBS Letters*, 590(22), pp. 4068–4083. doi: 10.1002/1873-3468.12299.
- Pervaiz, S., Taneja, R. and Ghaffari, S. (2009) 'Oxidative stress regulation of stem and progenitor cells.', *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), pp. 2777–89. doi: 10.1089/ars.2009.2804.
- Picelli, S. (2017) 'Single-cell RNA-sequencing: The future of genome biology is now', *RNA Biology*. Taylor & Francis, 14(5), pp. 637–650. doi: 10.1080/15476286.2016.1201618.
- Piddock, R. E., Bowles, K. M. and Rushworth, S. A. (2017) 'The role of PI3K isoforms in regulating bone marrow microenvironment signaling focusing on acute myeloid leukemia and multiple myeloma', *Cancers*, 9(4). doi: 10.3390/cancers9040029.
- Qiu, J., Papatsenko, D., Niu, X., Schaniel, C. and Moore, K. (2014) 'Divisional history and hematopoietic stem cell function during homeostasis', *Stem Cell Reports*. The Authors, 2(4), pp. 473–490. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.01.016.
- Quek, L., Otto, G. W., Garnett, C., Lhermitte, L., Karamitros, D., Stoilova, B., Lau, I.-J., Doondeea, J., Usukhbayar, B., Kennedy, A., Metzner, M., Goardon, N., Ivey, A., Allen, C., Gale, R., Davies, B., Sternberg, A., Killick, S., Hunter, H., Cahalin, P., Price, A., Carr, A., Griffiths, M., Virgo, P., Mackinnon, S., Grimwade, D., Freeman, S., Russell, N., Craddock, C., Mead, A., Peniket, A., Porcher, C. and Vyas, P. (2016) 'Genetically distinct leukemic stem cells in human CD34 - acute myeloid leukemia are arrested at a

- hemopoietic precursor-like stage', *The Journal of Experimental Medicine*, p. jem.20151775. doi: 10.1084/jem.20151775.
- Radomska, H. S., Huettner, C. S., Zhang, P., Cheng, T., Scadden, D. T. and Tenen, D. G. (1998) 'CCAAT / Enhancer Binding Protein α Is a Regulatory Switch Sufficient for Induction of Granulocytic Development from Bipotential Myeloid Progenitors', ... *and Cellular Biology*, 18(7), pp. 4301–14. doi: 10.1007/978-1-60327-977-2_5.
- Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Reza, R., Wojakowski, W. and Ratajczak, J. (2006) 'The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis.', *Leukemia*, 20(11), pp. 1915–1924. doi: 10.1038/sj.leu.2404357.
- Reed, K. R., Tunster, S. J., Young, M., Carrico, A., John, R. M. and Clarke, A. R. (2012) 'Entopic overexpression of Ascl2 does not accelerate tumourigenesis in ApcMin mice.', *Gut*, 61, pp. 1435–8. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300842.
- Reuter, C. W. M., Morgan, M. A. and Bergmann, L. (2000) 'Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?', *Blood*, 96(5), pp. 1655–1669.
- Reynaud, D., Ravet, E., Titeux, M., Re, L. and Dubart-kupperschmitt, A. (2005) 'HEMATOPOIESIS SCL / TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment', *Blood*, 106(7), pp. 2318–2328. doi: 10.1182/blood-2005-02-0557.Supported.
- Robb, L. (2007) 'Cytokine receptors and hematopoietic differentiation', *Oncogene*, 26(47), pp. 6715–6723. doi: 10.1038/sj.onc.1210756.
- Rouault-Pierre, K., Lopez-Onieva, L., Foster, K., Anjos-Afonso, F., Lamrissi-Garcia, I., Serrano-Sanchez, M., Mitter, R., Ivanovic, Z., de Verneuil, H., Gribben, J., Taussig, D., Rezvani, H. R., Mazurier, F. and Bonnet, D. (2013) 'HIF-2 α Protects Human Hematopoietic Stem/ Progenitors and Acute Myeloid Leukemic Cells from Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress', *Cell Stem Cell*, pp. 549–563. doi: 10.1016/j.stem.2013.08.011.
- Rumman, M., Dhawan, J. and Kassem, M. (2015) 'Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration', *STEM CELLS*, 33(10), pp. 2903–2912. doi: 10.1002/stem.2056.
- Saini, V., Marchese, A. and Majetschak, M. (2010) 'CXC Chemokine Receptor 4 Is a Cell Surface Receptor for Extracellular Ubiquitin', *Journal of Biological Chemistry*, 285(20), pp. 15566–15576. doi: 10.1074/jbc.M110.103408.
- Sánchez-Aguilera, A. and Méndez-Ferrer, S. (2016) 'The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia', *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 1–12. doi: 10.1007/s00018-016-2306-y.
- Sánchez-Alcañiz, J. A., Haegel, S., Mueller, W., Pla, R., Mackay, F., Schulz, S., López-Bendito, G., Stumm, R. and Marín, O. (2011) 'Cxcr7 Controls Neuronal Migration by Regulating Chemokine Responsiveness', *Neuron*, 69(1), pp. 77–90. doi: 10.1016/j.neuron.2010.12.006.
- Sarry, J., Murphy, K., Perry, R., Sanchez, P. V., Secreto, A., Keefer, C., Swider, C. R., Strzelecki, A., Cavelier, C., Récher, C., Mas, V. M., Delabesse, E. and Carroll, M. (2011) 'Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD / SCID / IL2R γ c-deficient mice', *J. Clin. Invest.*, 121(1), pp. 384–295. doi: 10.1172/JCI41495.384.
- Schieber, M. and Chandel, N. S. (2014) 'ROS function in redox signaling and oxidative stress', *Current Biology*, 24(10), pp. R453–R462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
- Schiedlmeier, B., Santos, A. C., Ribeiro, A., Moncaut, N., Lesinski, D., Auer, H., Kornacker, K., Ostertag, W., Baum, C., Mallo, M. and Klump, H. (2007) 'HOXB4's road map to stem cell expansion', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), pp. 16952–16957. doi: 10.1073/pnas.0703082104.
- Schuijers, J., Junker, J. P., Mokry, M., Hatzis, P., Koo, B. K., Sasselli, V., Van Der Flier, L. G., Cuppen, E., Van Oudenaarden, A. and Clevers, H. (2015) 'Ascl2 acts as an R-spondin/wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 16(2), pp. 158–170. doi: 10.1016/j.stem.2014.12.006.
- Schuurhuis, G. J., Meel, M. H., Wouters, F., Min, L. A., Terwijn, M., De Jonge, N. A., Kelder, A., Snel, A. N., Zweegman, S., Ossenkoppele, G. J. and Smit, L. (2013) 'Normal hematopoietic stem cells within the AML bone marrow have a distinct and higher ALDH activity level than co-existing leukemic stem cells', *PLoS ONE*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0078897.
- Scognamiglio, R., Cabezas-Wallscheid, N., Thier, M. C., Altamura, S., Reyes, A., Prendergast, M., Baumgartner, D., Carnevalli, L. S., Atzberger, A., Haas, S., Von Paleske, L., Boroviak, T., Wörstler, P., Essers, M. A. G., Kloz, U., Eisenman, R. N., Edenhofer, F., Bertone, P., Huber, W., Van Der Hoeven, F., Smith, A. and Trumpp, A. (2016) 'Myc Depletion Induces a Pluripotent Dormant State Mimicking Diapause', *Cell*, 164(4), pp. 668–680. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.033.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J. and Singh, H. (1994) 'Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages', *Science*, 265(5178), pp. 1573–1577.

- Seita, J. and Weissman, I. L. (2010) 'Hematopoietic stem cell: Self-renewal versus differentiation', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(6), pp. 640–653. doi: 10.1002/wsbm.86.
- Shafat, M. S., Gnaneswaran, B., Bowles, K. M. and Rushworth, S. A. (2017) 'The bone marrow microenvironment – Home of the leukemic blasts', *Blood Reviews*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.blre.2017.03.004.
- Shima, Y. and Kitabayashi, I. (2011) 'Deregulated transcription factors in leukemia', *International Journal of Hematology*, 94(2), pp. 134–141. doi: 10.1007/s12185-011-0905-9.
- Shlush, L. I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W. C., Brandwein, J. M., Gupta, V., Kennedy, J. A., Schimmer, A. D., Schuh, A. C., Yee, K. W., McLeod, J. L., Doedens, M., Medeiros, J. J. F., Marke, R., Kim, H. J., Lee, K., McPherson, J. D., Hudson, T. J., Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, T. H., Brown, A. M. K., Trinh, Q. M., Stein, L. D., Minden, M. D., Wang, J. C. Y. and Dick, J. E. (2014) 'Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia', *Nature*, 506(7488), pp. 328–333. doi: 10.1038/nature13038.
- Sierro, F., Biben, C., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R. M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., Harvey, R. P., Martinez-A, C., Mackay, C. R. and Mackay, F. (2007) 'Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), pp. 14759–14764. doi: 10.1073/pnas.0702229104.
- Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., DeBerardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., Schneider, J. W., Zhang, C. C. and Sadek, H. A. (2010) 'The Distinct Metabolic Profile of Hematopoietic Stem Cells Reflects Their Location in a Hypoxic Niche', *Cell Stem Cell*, 7(3), pp. 380–390. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.011.
- de Sousa E Melo, F., Colak, S., Buikhuisen, J., Koster, J., Cameron, K., de Jong, J. H., Tuynman, J. B., Prasetyanti, P. R., Fessler, E., van den Bergh, S. P., Rodermond, H., Dekker, E., van der Loos, C. M., Pals, S. T., van de Vijver, M. J., Versteeg, R., Richel, D. J., Vermeulen, L. and Medema, J. P. (2011) 'Methylation of Cancer-Stem-Cell-Associated Wnt Target Genes Predicts Poor Prognosis in Colorectal Cancer Patients', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 9(5), pp. 476–485. doi: 10.1016/j.stem.2011.10.008.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S. and Weissman, I. L. (1988) 'Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells', *SCIENCE*, 241.
- Spoor, A. C., Lübbert, M., Wierda, W. G. and Burger, J. A. (2007) 'CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia', *Blood*, 109(2), pp. 786–791. doi: 10.1182/blood-2006-05-024844.
- Steensma, D. P., McClure, R. F., Karp, J. E., Tefferi, A., Lasho, T. L., Powell, H. L., DeWald, G. W. and Kaufmann, S. H. (2006) 'JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained', *Leukemia*, 20(6), pp. 971–978. doi: 10.1038/sj.leu.2404206.
- Storz, P. (2011) 'Forkhead Homeobox Type O Transcription Factors in the Responses to Oxidative Stress', *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(4), pp. 593–605. doi: 10.1089/ars.2010.3405.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. and Nagasawa, T. (2006) 'Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches', *Immunity*, 25(6), pp. 977–988. doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.016.
- Summer, R., Kotton, D. N., Sun, X., Ma, B., Fitzsimmons, K. and Fine, A. (2003) 'Side population cells and Bcrp1 expression in lung', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(1), pp. L97–L104. doi: 10.1152/ajplung.00009.2003.
- Sutherland, H., Blair, A. and Zapf, R. (1996) 'Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells.', *Blood*, 87(11), pp. 4754–61.
- Tabe, Y. and Konopleva, M. (2014) 'Advances in understanding the leukaemia microenvironment', *British Journal of Haematology*, 164(6), pp. 767–778. doi: 10.1111/bjh.12725.
- Tanaka, M., Puchyr, M., Gertsenstein, M., Harpal, K., Jaenisch, R., Rossant, J. and Nagy, A. (1999) 'Parental origin-specific expression of Mash2 is established at the time of implantation with its imprinting mechanism highly resistant to genome-wide demethylation', *Mechanisms of Development*, 87(1–2), pp. 129–142. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00158-6.
- Terpstra, W., Ploemacher, R. E., Prins, A., van Lom, K., Pouwels, K., Wognum, A. W., Wagemaker, G., Löwenberg, B. and Wielenga, J. J. (1996) 'Fluorouracil selectively spares acute myeloid leukemia cells with long-term growth abilities in immunodeficient mice and in culture.', *Blood*, 88(6), pp. 1944–50. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/88/6/1944.abstract>.
- Terstappen, L. W. M. M., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. M. and Loken, M. R. (1991) 'Sequential Generations of Hematopoietic Colonies Derived From Single Nonlineage-Committed CD34+CD38- Progenitor Cells', *Blood*, 77(6), pp. 1218–1227.
- Testa, U. and Riccioni, R. (2007) 'Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia', *Haematologica*, 92(1), pp. 81–94. doi: 10.3324/haematol.10279.

- Thayer, S. P., di Magliano, M. P., Heiser, P. W., Nielsen, C. M., Roberts, D. J., Lauwers, G. Y., Qi, Y. P., Gysin, S., Castillo, C. F., Yajnik, V., Antoniu, B., McMahon, M., Warshaw, A. L. and Hebrok, M. (2003) 'Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis', *Nature*, 425(6960), pp. 851–856. doi: 10.1038/nature02009.
- Thomas, D. and Majeti, R. (2017) 'Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells', *Blood*, 129(12), pp. 1577–1586. doi: 10.1182/blood-2016-10-696054.
- Till, J. E. and McCulloch, E. A. (1961) 'A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells', *Radiation Research*, 14(2), p. 213. doi: 10.2307/3570892.
- Torossian, F., Anginot, A., Chabanon, A., Clay, D., Guerton, B., Desterke, C., Boutin, L., Marullo, S., Scott, M. G. H., Lataillade, J.-J. and Le Bousse-Kerdiles, M.-C. (2014) 'CXCR7 participates in CXCL12-induced CD34+ cell cycling through -arrestin-dependent Akt activation', *Blood*, 123(2), pp. 191–202. doi: 10.1182/blood-2013-05-500496.
- Torres-Arzuayus, M. I., De Mora, J. F., Yuan, J., Vazquez, F., Bronson, R., Rue, M., Sellers, W. R. and Brown, M. (2004) 'High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene', *Cancer Cell*, 6(3), pp. 263–274. doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.027.
- Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B. J., Lee, B. H., Castrillon, D. H., Cullen, D. E., McDowell, E. P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I. R., Sears, C., Armstrong, S. A., Passegué, E., DePinho, R. A. and Gilliland, D. G. (2007) 'FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress', *Cell*, 128(2), pp. 325–339. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.003.
- Tourneur, L., Delluc, S., Lévy, V., Valensi, F., Radford-Weiss, I., Legrand, O., Vargaftig, J., Boix, C., Macintyre, E. A., Varet, B., Chiochia, G. and Buzyn, A. (2004) 'Absence or low expression of fas-associated protein with death domain in acute myeloid leukemia cells predicts resistance to chemotherapy and poor outcome', *Cancer Research*, 64(21), pp. 8101–8108. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2361.
- Tran, H. (2002) 'DNA Repair Pathway Stimulated by the Forkhead Transcription Factor FOXO3a Through the Gadd45 Protein', *Science*, 296(5567), pp. 530–534. doi: 10.1126/science.1068712.
- Ugarte, F., Sousae, R., Cinquin, B., Martin, E. W., Krietsch, J., Sanchez, G., Inman, M., Tsang, H., Warr, M., Passegué, E., Larabell, C. A. and Forsberg, E. C. (2015) 'Progressive chromatin condensation and H3K9 methylation regulate the differentiation of embryonic and hematopoietic stem cells', *Stem Cell Reports*, 5(5), pp. 728–740. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.09.009.
- Umamoto, Y., Tsuji, K., Yang, F. C., Ebihara, Y., Kaneko, A., Furukawa, S. and Nakahata, T. (1997) 'Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells.', *Blood*, 90(9), pp. 3438–43. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/90/9/3438.abstract>.
- Uto-Konomi, A., McKibben, B., Wirtz, J., Sato, Y., Takano, A., Nanki, T. and Suzuki, S. (2013) 'CXCR7 agonists inhibit the function of CXCL12 by down-regulation of CXCR4', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(4), pp. 772–776. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.032.
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Le Beau, M. M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A. and Bloomfield, C. D. (2009) 'The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes', *Blood*, 114(5), pp. 937–951. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262.
- Velten, L., Haas, S., Raffel, S., Blaszkiewicz, S., Islam, S., Hennig, B., Hirche, C., Lutz, C., Buss, E. C., Nowak, D., Boch, T., Hofmann, W.-K., Ho, A. D., Huber, W., Trumpp, A., Essers, M. A. G. and Steinmetz, L. M. (2017) 'Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process', *Nature Cell Biology*, 19(4). doi: 10.1038/ncb3493.
- Venezia, T. A., Merchant, A. A., Ramos, C. A., Whitehouse, N. L., Young, A. S., Shaw, C. A. and Goodell, M. A. (2004) 'Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells', *PLoS Biology*, 2(10). doi: 10.1371/journal.pbio.0020301.
- Vicente, C., Vázquez, I., Marcotegui, N., Conchillo, A., Carranza, C., Rivell, G., Bandrés, E., Cristobal, I., Lahortiga, I., Calasanz, M. J. and Odero, M. D. (2007) 'JAK2-V617F activating mutation in acute myeloid leukemia: prognostic impact and association with other molecular markers', *Leukemia*, 21(11), pp. 2386–2390. doi: 10.1038/sj.leu.2404812.
- Walter, D., Lier, A., Geiselhart, A., Thalheimer, F. B., Huntscha, S., Sobotta, M. C., Moehrl, B., Brocks, D., Bayindir, I., Kaschutnig, P., Muedder, K., Klein, C., Jauch, A., Schroeder, T., Geiger, H., Dick, T. P., Holland-Letz, T., Schmezer, P., Lane, S. W., Rieger, M. A., Essers, M. A. G., Williams, D. A., Trumpp, A. and Milsom, M. D. (2015) 'Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells', *Nature*, 520(7548), pp. 549–552. doi: 10.1038/nature14131.
- Walter, M. J., Payton, J. E., Ries, R. E., Shannon, W. D., Deshmukh, H., Zhao, Y., Baty, J., Heath, S., Westervelt, P., Watson, M. a, Tomasson, M. H., Nagarajan, R., O'Gara, B. P., Bloomfield, C. D., Mrózek, K., Selzer, R. R., Richmond, T. a, Kitzman, J., Geoghegan, J., Eis, P. S., Maupin, R., Fulton, R. S., McLellan, M., Wilson, R. K., Mardis, E. R., Link, D. C., Graubert, T. a, DiPersio, J. F. and Ley, T. J. (2009) 'Acquired copy number

- alterations in adult acute myeloid leukemia genomes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), pp. 12950–5. doi: 10.1073/pnas.0903091106.
- Wang, C., Wang, M., Arrington, J., Shan, T., Yue, F., Nie, Y., Tao, W. A. and Kuang, S. (2016) 'Ascl2 inhibits myogenesis by antagonizing the transcriptional activity of myogenic regulatory factors', *Development*, (December), p. dev.138099. doi: 10.1242/dev.138099.
- Wang, C., Wang, M., Arrington, J., Shan, T., Yue, F., Nie, Y., Tao, W. A. and Kuang, S. (2017) 'Ascl2 inhibits myogenesis by antagonizing the transcriptional activity of myogenic regulatory factors.', *Development (Cambridge, England)*, 144(2), pp. 235–247. doi: 10.1242/dev.138099.
- Wang, H., Beaty, N., Chen, S., Qi, C., Masiuk, M., Shin, D., Iii, H. C. M. and Dc, W. (2012) 'The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12 Brief report The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12', *Immunobiology*, 119(2), pp. 465–468. doi: 10.1182/blood-2011-03-343608.
- Wang, J., Wang, J., Dai, J., Jung, Y., Wei, C.-L., Wang, Y., Havens, A. M., Hogg, P. J., Keller, E. T., Pienta, K. J., Nor, J. E., Wang, C.-Y. and Taichman, R. S. (2007) 'A Glycolytic Mechanism Regulating an Angiogenic Switch in Prostate Cancer', *Cancer Research*, 67(1), pp. 149–159. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2971.
- Watkins, D. N., Berman, D. M., Burkholder, S. G., Wang, B., Beachy, P. A. and Baylin, S. B. (2003) 'Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer', *Nature*, 422(6929), pp. 313–317. doi: 10.1038/nature01493.
- Wentzensen, N., Bakkum-Gamez, J. N., Killian, J. K., Sampson, J., Guido, R., Glass, A., Adams, L., Luhn, P., Brinton, L. A., Rush, B., D'Ambrosio, L., Gunja, M., Yang, H. P., Garcia-Closas, M., Lacey, J. V., Lissowska, J., Podratz, K., Meltzer, P., Shridhar, V. and Sherman, M. E. (2014) 'Discovery and validation of methylation markers for endometrial cancer', *International Journal of Cancer*, 135(8), pp. 1860–1868. doi: 10.1002/ijc.28843.
- Westerman, B. A., Poutsma, A., Looijenga, L. H. J., Wouters, D., Van Wijk, I. J. and Oudejans, C. B. M. (2001) 'The Human Achaete Scute Homolog 2 gene contains two promoters, generating overlapping transcripts and encoding two proteins with different nuclear localization', *Placenta*, 22(6), pp. 511–518. doi: 10.1053/plac.2001.0695.
- Wilson, A. and Trumpp, A. (2006) 'Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches', *Nature Reviews Immunology*, 6(2), pp. 93–106. doi: 10.1038/nri1779.
- Wilson, N. K., Kent, D. G., Buettner, F., Shehata, M., Macaulay, I. C., Calero-Nieto, F. J., Sánchez Castillo, M., Oedekoven, C. A., Diamanti, E., Schulte, R., Ponting, C. P., Voet, T., Caldas, C., Stingl, J., Green, A. R., Theis, F. J. and Göttgens, B. (2015) 'Combined Single-Cell Functional and Gene Expression Analysis Resolves Heterogeneity within Stem Cell Populations', *Cell Stem Cell*, 16(6), pp. 712–724. doi: 10.1016/j.stem.2015.04.004.
- Wilson, N. S., Dixit, V. and Ashkenazi, A. (2009) 'Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks', *Nature Immunology*, 10(4), pp. 348–355. doi: 10.1038/ni.1714.
- Winkler, I. G., Sims, N. a, Pettit, A. R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F. and Ingrid, J. (2010) 'Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSC Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSC', *Blood*, 116(23), pp. 4815–4829. doi: 10.1182/blood-2009-11-253534.
- Xie, Y., Yin, T., Wiegraeb, W., He, X. C., Miller, D., Stark, D., Perko, K., Alexander, R., Schwartz, J., Grindley, J. C., Park, J., Haug, J. S., Wunderlich, J. P., Li, H., Zhang, S., Johnson, T., Feldman, R. A. and Li, L. (2009) 'Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging', *Nature*, 457(7225), pp. 97–101. doi: 10.1038/nature07639.
- Xu, Q., Thompson, J. E. and Carroll, M. (2009) 'mTOR regulates cell survival after etoposide treatment cells', 106(13), pp. 1–14. doi: 10.1182/blood-2004-11-4468. Copyright.
- Xu, X., Duan, S., Yi, F., Ocampo, A., Liu, G.-H. and Izpisua Belmonte, J. C. (2013) 'Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells.', *Cell metabolism*. Elsevier Inc., 18(3), pp. 325–32. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.005.
- Yahata, T., Takanashi, T., Muguruma, Y., Ibrahim, A. A., Matsuzawa, H., Uno, T., Sheng, Y., Onizuka, M., Ito, M., Kato, S. and Ando, K. (2015) 'Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells', *Blood*, 118(11), pp. 2941–2951. doi: 10.1182/blood-2011-01-330050.An.
- Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M. M., Karlsson, S., Iwama, A. and Nakauchi, H. (2011) 'Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche', *Cell*, 147(5), pp. 1146–1158. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.053.
- Yan, K. S. and Kuo, C. J. (2015) 'Ascl2 reinforces intestinal stem cell identity', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 16(2), pp. 105–106. doi: 10.1016/j.stem.2015.01.014.

- Yilmaz, Ö. H., Kiel, M. J. and Morrison, S. J. (2006) 'SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity', *Blood*, 107(3), pp. 924–930. doi: 10.1182/blood-2005-05-2140.
- Yoder, M. C. (2014) 'news and views Inducing definitive hematopoiesis in a dish', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 32(6), pp. 539–541. doi: 10.1038/nbt.2929.
- Van Zant, G. (1984) 'Studies of hematopoietic stem cells spared by 5-fluorouracil.', *The Journal of experimental medicine*, 159(3), pp. 679–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6699542>.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y. and Li, L. (2003) 'Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size', *Nature*, 425(October), pp. 836–841. doi: 10.1038/nature02064.1.
- Zhang, Y., Abdelouahab, H., Wittner, M., Betems, A., Vainchenker, W., U, L. F. I. and Roussy, I. G. (2012) *CXCR4* invalidation limits the MLL-ENL induced leukemogenesis in vivo.
- Zhang, Y., Chen, A., Yan, X. M. and Huang, G. (2012) 'Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia', *International Journal of Hematology*, 96(4), pp. 428–437. doi: 10.1007/s12185-012-1180-0.
- Zheng, J., Huynh, H., Umikawa, M., Silvany, R. and Zhang, C. C. (2011) 'Angiopoietin-like protein 3 supports the activity of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche', *Blood*, 117(2), pp. 470–479. doi: 10.1182/blood-2010-06-291716.
- Zhou, J., Wu, J., Li, B., Liu, D., Yu, J., Yan, X., Zheng, S., Wang, J., Zhang, L., Zhang, L., He, F., Li, Q., Chen, A., Zhang, Y., Zhao, X., Guan, Y., Zhao, X., Yan, J., Ni, J., Nobrega, M. A., Löwenberg, B., Delwel, R., Valk, P. J. M., Kumar, A., Xie, L., Tenen, D. G., Huang, G. and Wang, Q. (2014) 'PU.1 is essential for MLL leukemia partially via crosstalk with the MEIS/HOX pathway', *Leukemia*, 28(7), pp. 1436–1448. doi: 10.1038/leu.2013.384.

Annexes

Article 3 en collaboration au sein de l'unité U1170 :

« Establishment of acute myeloid leukemic xenograft as preclinical models of epigenetic therapies ». International Journal of Hematology Research, 2015.

Satyananda Patel, Yanyan Zhang, Audrey Cras, Mallorie Mangean-Dépond, Fabien Zassadowski, Victor Maud, Bruno Cassinat, Christine Chomienne, Fawzia Louache.

INTRODUCTION

The majority of acute myeloid leukemia (AML) patients are treated with intensive chemotherapy with serious limiting side effects for older age patients and unfortunately with short complete remissions. The persistence of a subpopulation of cells called leukemia-initiating cells (LIC) resistant to chemotherapy would be responsible for relapses^[1]. Thus AML treatment still requires improved efficacy while preserving quality of life and alternative approaches and targets are currently being tested.

Aberrant DNA methylation signatures are common in AML and myelodysplastic syndrome (MDS) patients with mutations in genes coding for key proteins such as DNA methyl transferase 3 (DNMT3), Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2), Isocitrate Dehydrogenase 1/2 (IDH1/2) and Histone deacetylase (HDAC)^[2]. Unlike deletions or mutations of tumor suppressor genes, altered chromatin modifications are reversible and thus novel approaches such as chromatin remodeling or epigenetic therapy has been investigated as potential anti-cancer therapeutic approaches^[3-6].

5-aza-2'-deoxycytidine (AZA), a DNA methyl transferase inhibitor, is currently in clinical practice for patients with MDS^[7] and with acute and chronic leukemia^[8]. Of the HDAC inhibitors, the short chain fatty acid, valproic acid (2-propylpentanoic acid; VPA), used since many years in the treatment of epilepsy and mood stabilizer^[9], was shown to stimulate differentiation and/or inhibit cell growth of leukemia^[10], but has limited clinical activity on its own in MDS^[11] or AML^[12] patients. All-trans retinoic acid (ATRA) can induce hypomethylation and its activity is enhanced by AZA^[13]. PLZF-RARA acute promyelocytic leukemia (APL) variant resistance to ATRA can be reversed by the addition of HDAC inhibitors (Trichostatin A or sodium phenyl butyrate) both *in vivo* and *in vitro*^[14]. VPA and AZA have been shown to sensitize AML cells for ATRA^[11,12,15]. The *in vitro* data showed that, the combination had differentiation effect in leukemic cell line (HL-60 and MOLT4)^[16]. Such combinations are also effective in solid tumors^[17,18].

Based on these *in vitro* data, clinical trials have been initiated to investigate the use of HDAC inhibitors, in combination with retinoic acid and/or DNMT inhibitors, for the treatment of solid tumors^[19] and myeloid malignancies^[20,21]. We have participated in a phase 2 clinical trial study, where the combination of AZA, VPA and ATRA was studied in 65 patients (median age 72, Ranging from 50-87 years) with high risk AML and MDS^[21]. Of the 65 patients that received the 6 cycles of the combination AZA, VPA and ATRA, 17 (26%) responded (14 achieved complete remission and 3 partial remission)^[21], highlighting both the potential and limitation of these therapies as heterogeneity in the responses are observed.

In order, to increase the number of patients likely to respond to more effective DNMT inhibitor and HDAC inhibitor combinations, preclinical models that reflect patients' responses are mandatory. Indeed, *In vitro* cultures of fresh AML cells are not sufficient, as they do not always predict *in vivo* preclinical efficacy or toxicity. Furthermore, AZA's mechanism of action at the DNA level requires promoter accessibility which is best obtained during DNA synthesis and replication, and difficult to obtain in fresh AML cells in conventional liquid cultures. Considering the important place of AML mouse xenografts to study both human leukemogenesis and leukemic stem cells, we have developed a set of AML xenografts as a preclinical platform to study the efficacy of AZA, VPA and

ATRA combination in AML. Acute promyelocytic leukemia (APL, AML3 subtype) were excluded as ATRA induces leukemic cell differentiation and complete remission in a high proportion of APL patients^[22], as well as shown by us in APL xenografts^[23].

In this study, we show for the first time that AML preclinical xenografts can be used to identify the AML samples sensitive to the AZA, VPA and ATRA combination and thus providing excellent models for assessing more potent epigenetic drug combinations for all AML patients.

MATERIALS AND METHODS

Patient samples

Peripheral blood (PB) and/or bone marrow (BM) samples from AML patients were obtained at diagnosis after informed consent (Table S1). BM and PB mononuclear cells were isolated using density-gradient centrifugation. Cells were injected intravenously into NOD/shi-SCID IL2R γ ^{-/-} (NOG) mice either fresh or after storage in liquid-nitrogen.

NOG xenotransplantation assays

NOG mice provided from M Ito^[24], were bred in the pathogen-free breeding facility at Gustave Roussy, Villejuif. All animal experiments were performed in accordance with the French Ministry on animal health care regulation. Human CD45 cells (1 \times 10⁶ cells) per mouse were transplanted intravenously into 6–8-week-old NOG mice, conditioned with either sub-lethal irradiation (3 Gy) or Busulfan treatment (25mg/kg/d twice 24 hours before)^[23,25,26]. PB samples were taken once a month to validate the engraftment.

Determination of the maximum tolerable dose (MTD) for AZA and VPA in NOG mice

Eight-week-old NOG mice ($n=5$ in each cohort) were injected intraperitoneally (300 μ L per injection) with AZA (0.1 or 0.4 mg/kg) or VPA (125, 250, 400 and 1200 mg/kg) daily over a period of 7 days. Measurements of various hematological parameters of blood were performed using the "Melet Schloesing MS9-5V hematology analyzer (Melet Schloesing Laboratoires, Osny, France)". The MTD was defined as the dose at which all animals survived the 7 days treatment period and the consecutive 21 days of observation and at which overt clinical signs of toxicity, such as body weight loss and mortality were absent. In addition, blood cell counts were measured before treatment, during the treatment, and after the observation period to detect delayed effects of the substances.

Flow cytometry analysis and cell purification

A panel of FITC, PE, PC7, PerCP or APC-conjugated antibodies was used against mouse CD45, human CD45, CD33, CD38, CD11b, CD15, CD14, CD34, CD44, CXCR4, CD47, CD117, CD123 (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France). Human CD45⁺ (hCD45⁺) cells from xenotransplanted mice were purified by a double-positive magnetic cell sorting system (AutoMACS, Miltenyi Biotec, France).

Experiments on AML xenografts

Once AML engraftment was confirmed (hCD45⁺>1%), mice were recruited to the experiments. The experiments comprise 3 groups of xenografts: control group (Placebo), ATRA group and AVA (AZA+VPA+ATRA) group. Mice were bled at day-0, day-8 (before ATRA implantation), day-18 and on day 29. On day 29, bleeding was followed by sacrifice and collection of BM cells and spleen cells. Self-renewal capacity was assessed by secondary transplantations of equal numbers of BM hCD45⁺ cells in conditioned mice.

Experiments on normal human hematopoiesis

For murine hematopoiesis, 8 weeks old C57BL/6 mice were used. For human hematopoiesis, mononuclear cells were separated from human cord blood over a ficoll density gradient. CD34 positive cells were isolated by a double positive magnetic cell sorting system (AutoMACS; Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. CD34 positive cells (5×10^4) were transplanted intravenously into 6–8-week-old conditioned NOG mice. After validation of human engraftment, mice were treated with PBS or 0.1mg/kg/day AZA and 250mg/kg/day VPA for 7 days and on day 8 ATRA pellets (21day release) were implanted in treated group and untreated were subjected to the same condition without drugs. At the end of the experiment, mice were sacrificed and processed for various read outs in blood, BM and spleen.

Western blot

For Western blot, BM cells were lysed in SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mmol/L Tris/HCl (pH 7.4), 1 mmol/L vanadate) and proteins were denatured by the addition of SDS-Gel loading buffer containing dithiothreitol (DTT) followed by heating in boiling water for 10 minutes. Equal amounts of proteins were separated on a 10% SDS polyacrylamide gel and blotted onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). After blocking, the membranes were incubated with rabbit anti-acetylated lysine (Cell signaling technology, Cat No #9441; 1:1000) antibodies diluted in 5% milk in PBST overnight at 4°C. The peroxidase-conjugated Donkey anti-rabbit IgG (Sigma; 1:20,000 in 5% milk in PBST) served as secondary antibody. The bands of acetylated-H3 and acetylated-H4 were found in the range 15KD–20KD. Signals were visualized using the Supersignal West Dura detection system (Thermo Scientific). Signal intensities were measured by densitometric analysis using the Scion Image (Scion Corporation).

DNA methylation

The global methylated DNA was estimated in the BM hCD45⁺ cells of NOG mice according to the manufacturer's instruction {Epigentek [MethylFlash™ methylated DNA Quantification kit (Colorimetric) #P-1034], NY, USA}. Briefly genomic DNA was extracted by Qiagen kit according to the recommendation of the manufacturer. DNA (200ng) was incubated with capture antibody against methylated DNA. Addition of detection antibody was followed by the addition of developing solution and then plate reading was performed in a spectrophotometer. The quantity of methylated DNA was interpolated from the standard curve processed at the same time and the percentage of methylated DNA was calculated and compared to control mice.

Human myeloid colony assays

Purified hCD45⁺ BM cells (10^5) from AML xenograft cells were suspended in 500 μ l α -MEM, and cultured in 1.8 mL complete methylcellulose medium allowing the selective proliferation of human progenitor cells (0.8% methylcellulose medium H4100 Stem Cell Technologies, Grenoble, France), 30% FBS, 1% deionized BSA, 10⁻⁴ mol/L β -mercaptoethanol) with the addition of 25 ng/mL human Stem Cell Factor (Biovitrum AB, Stockholm, Sweden), 10 ng/mL interleukin-3 (Peprotech, France), 2 U/mL erythropoietin (Amgen, Thousand Oaks, CA), and 10ng/ml rhu-GM-CSF (Peprotech, France). Plates were incubated at 37°C in an air atmosphere supplemented with 5% CO₂ and saturated with humidity. Progenitors were scored at day 14.

Statistics

Kaplan-Meier analyses were used to assay the survival. Unless otherwise stated, data represent means \pm SEM of at least 3 mice. Statistically significant differences between means were calculated using the non-parametric, unpaired, two tailed, student t-test with a threshold of $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$ designated by *, \$, # respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

To set up a preclinical model of DNMT inhibitor and HDAC inhibitor combination with AZA, VPA and ATRA used in clinical trials, we first studied, in two different mice strains NOD/shi-SCID IL2R $\gamma^{-/-}$ (NOG) and C57/BL6, the AZA and VPA doses that were well tolerated and effective to induce DNA hypomethylation and histone acetylation (Figure 1). Different doses of AZA (0.1 and 0.4 mg/kg/day) and VPA (125, 250, 400, 1200mg/kg/day) were injected intraperitoneally for 7 consecutive days and mice were monitored for the 21 following days. Based on cumulative survival (Figure 1A and 1Bi) and body weight (Figure 1Bii), the tolerated doses for VPA and AZA in NOG mice and in C57/BL6 (not shown) were identified to be 250mg/kg/day and 0.1mg/kg/day respectively, within the range of reported doses in SCID mice^[27]. As expected, these doses induced global DNA demethylation (Figure 1C) ($p \leq 0.01$ compared to the control/untreated) and histone acetylation (Figure 1D) of bone marrow mononuclear cells by spectrophotometric and western blotting assays, respectively.

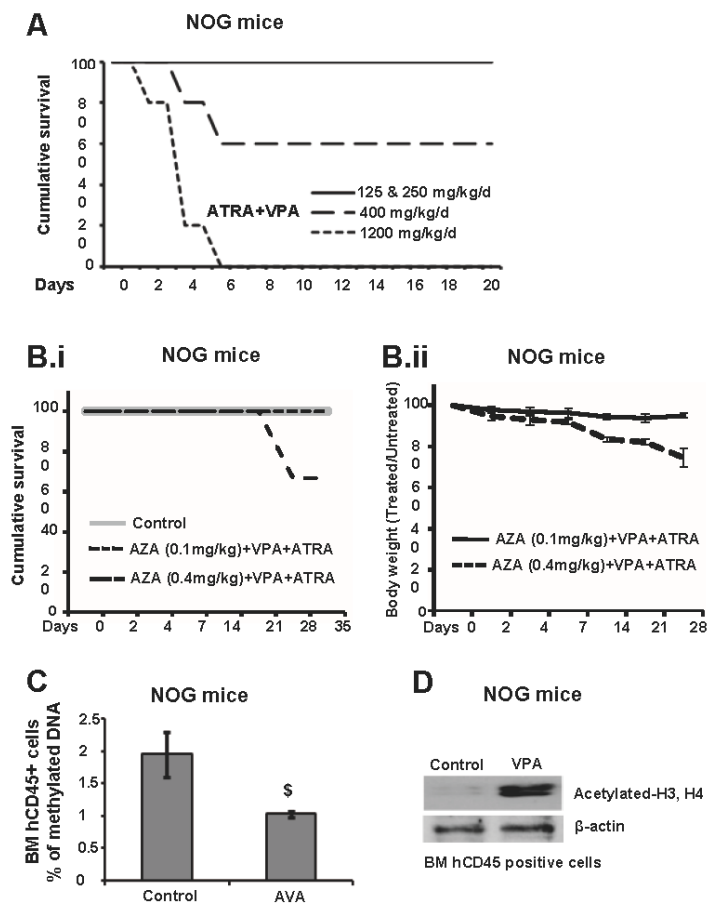


Figure 1 Determination of the maximum tolerable dose (MTD) and effective dose of AZA, VPA and ATRA in NOG mice.

Table 1 Characteristics of the AML patient samples.

Patient No	FAB	WBC ($\times 10^9$)	FIt3-ITD status	Source of Sample (% Blasts)	CD34+ CD34+ (%)	CD34+ CD38- (%) in CD34+	CD34+ CD38+ (%) in CD34+	CD44+ (%) In CD34+	CXCR4+ (%) in CD34+	CD123+ (%) in CD34+	CD47+ (%) in CD34+	CD117+ (%) in CD34+	No of mice positive for engraftment	AML Engraftment (% of hCD45)
P1	0	244	-	Blood (95)	88	18%	86%	100%	100%	88%	100%	23%	5/5	Blood: 63±7% BM: 86±10% Spleen: 75±14%
P2	ND	ND	-	Bone Marrow (ND)	99	ND	ND	ND	98%	95%	100%	7%	2/8	Blood: 76±3% BM: 70±3% Spleen: 30±8% (8 weeks)
P3	5a	84.5	+	Blood (85)	78	8%	92%	100%	2%	81%	100%	81%	5/5	Blood: 28±14% BM: 63±19% Spleen: 22±14% (9 weeks)
P4	2	75	+	Blood (88)	56	27%	73%	100%	46%	56%	100%	56%	5/5	Blood: 4±1% BM: 33±3% Spleen: 2±0.5% (12 weeks)
P5	5	25.5	-	Blood (31)	53	5%	95%	100%	5%	86%	100%	28%	5/5	Blood: 73±15% BM: 97±2% Spleen: 67±13% (15 weeks)

ND: Not done or no data.

We then studied the effects of the AVA combination in 5 different AML xenografts, according to the protocol described in Figure 2A. AML xenografts were obtained as previously described by Patel *et al.*^[23] and Zhang *et al.*^[20]. AML cell patients' characteristics at diagnosis are shown in Table 1. Before initiation of treatment, confirmation of leukemia development was determined by flow cytometry. The left panels of figure 2B show the anti human and anti mouse CD45 antibody labeling performed on the PB of xenografts for each patient sample. The lymphoid CD19 and myeloid CD33 marker profile in the hCD45+ population shown in the right panels indicated a robust leukemic engraftment in xenografted mice. Mice were then randomized and injected intraperitoneally with VPA (250mg/kg/d) and AZA (0.1mg/kg/d) for 7 consecutive days followed by sub-cutaneous implantation of one 10mg ATRA 21 daylong releasing pellet. AVA-treated AML xenografts were compared with untreated (Sham-operated) and ATRA treated xenografts. For these comparisons, we analyzed the expression of specific hematopoietic cell surface markers or Cluster of Differentiation (CD) proteins by flow cytometry. CD34 is a surface marker of undifferentiated cells and its down regulation suggests that the cells have progressed down one of the various hematopoietic differentiation cell lineages. As cells differentiate to myeloid lineage, they express various markers of mature cells including CD11b (myeloid marker), CD15 (granulocytic marker) and CD14 (monocytic marker).

Depending on the leukemic aggressiveness and mice survival, the level of activity of each treatment on leukemia development within the peripheral blood and bone marrow was evaluated at either day 18 or day 29. Results are expressed as percentages of hCD45 leukemic cells in PB (Figure 3A, first row, the columns from left to right in each row represent the data of each AML xenograft of the 5 AML patient sampels, P1, P2, P3, P4 and P5) and absolute numbers in PB (Figure 3A, second row) and BM (Figure 3A, third row) of AML xenografts. In addition, the percentage of hCD45+ leukemic cells expressing selected differentiation markers was evaluated in PB at day 18 (Figure 3B, rows a, b, c, d correspond to the percentage of CD34, CD11b, CD15 and CD14 positive cells within the hCD45+ population, respectively) and at day 29 (figure 4B). The same assessment was performed on BM hCD45+ leukemic cells at either day 29 or day 18 (Figure 4A) depending on mice survival.

We observed three different groups of responses to AVA or ATRA treatment of AML patient xenografts.

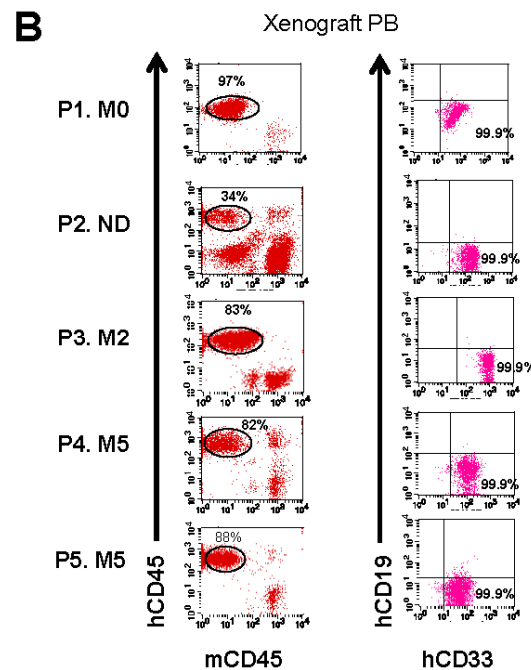
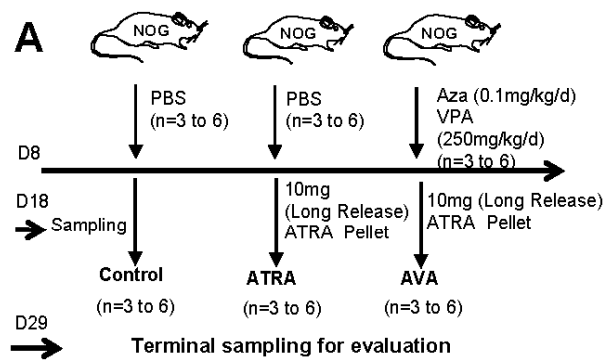


Figure 2 Schematic diagram of the experimental procedure and validation of AML xenografts.

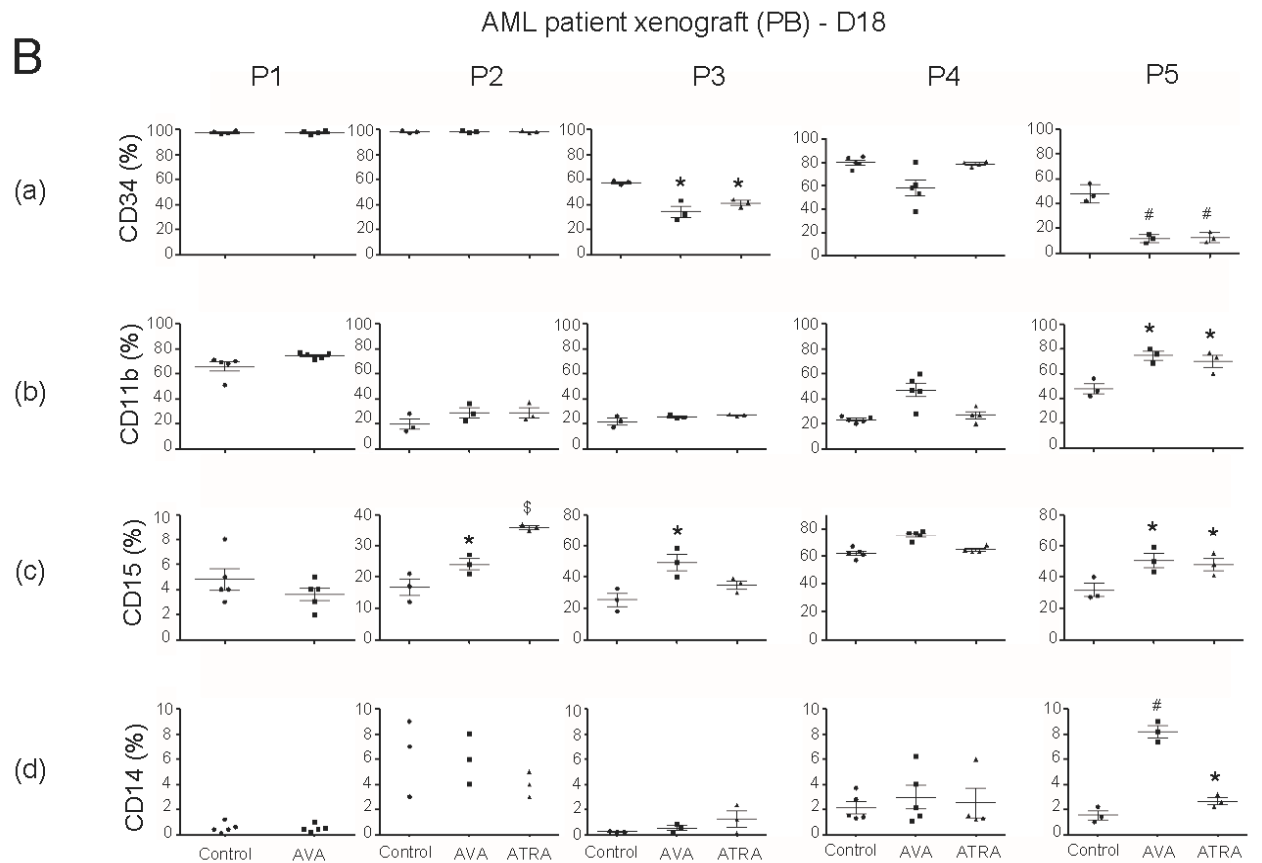
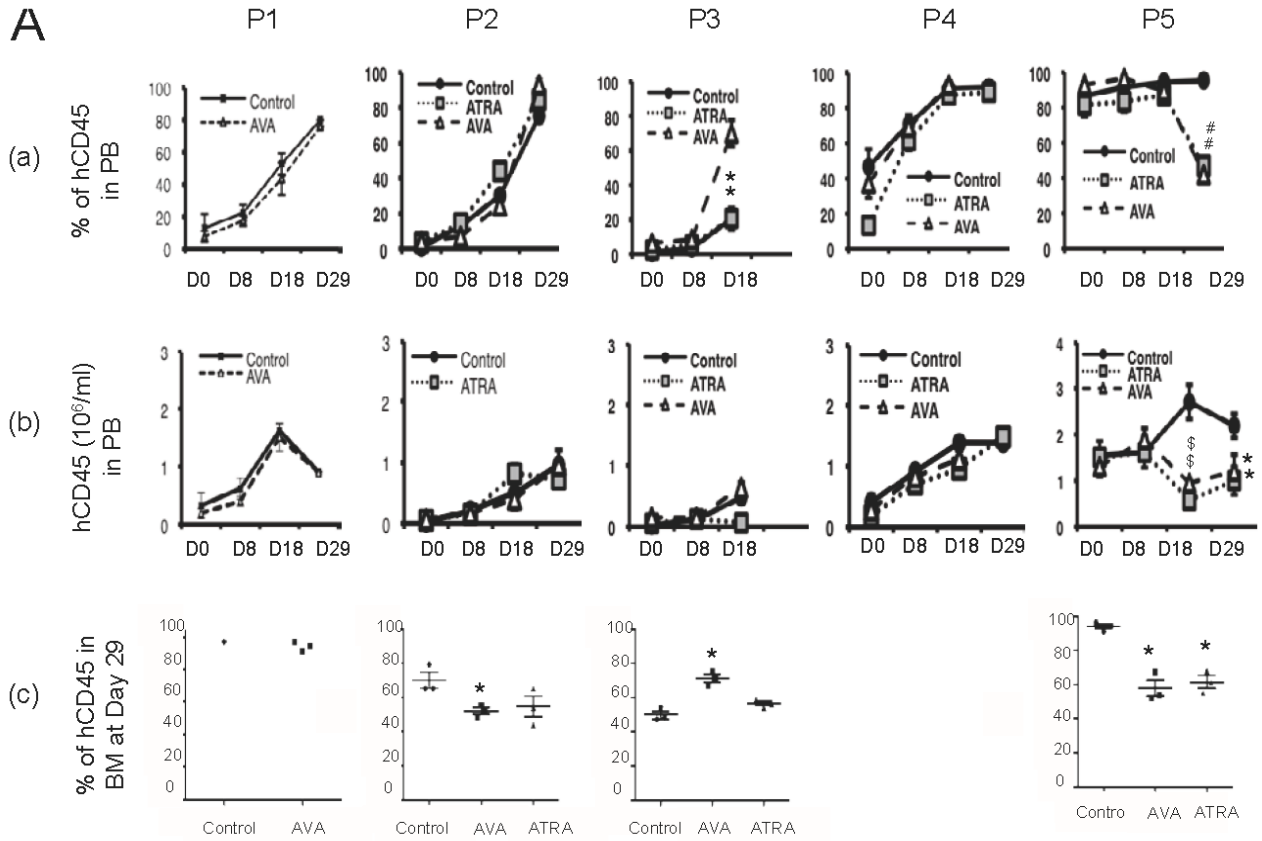


Figure 3 Treatment of AML xenografts by AVA combination or ATRA.

Non-responsive group: this group includes AML patient 1 (P1) xenografts ($n=6$) for whom, only minor modifications were detected in the peripheral blood (PB) (Figure 3A P1a, b) and bone marrow (BM) (Figure 3A P1c) in response to treatment whether in the percentage (Figure 3A P1a) or absolute cell counts of hCD45 cells (Figure 3A

P1b). In addition, no significant modifications in the expression of the differentiation markers CD34, CD11b, CD15 and CD14 within the hCD45⁺ cells could be detected in the PB at day18 (Figure 3B, a, b, c, d) or at day 29 in BM (Figure 4A) or PB (Figure 4B).

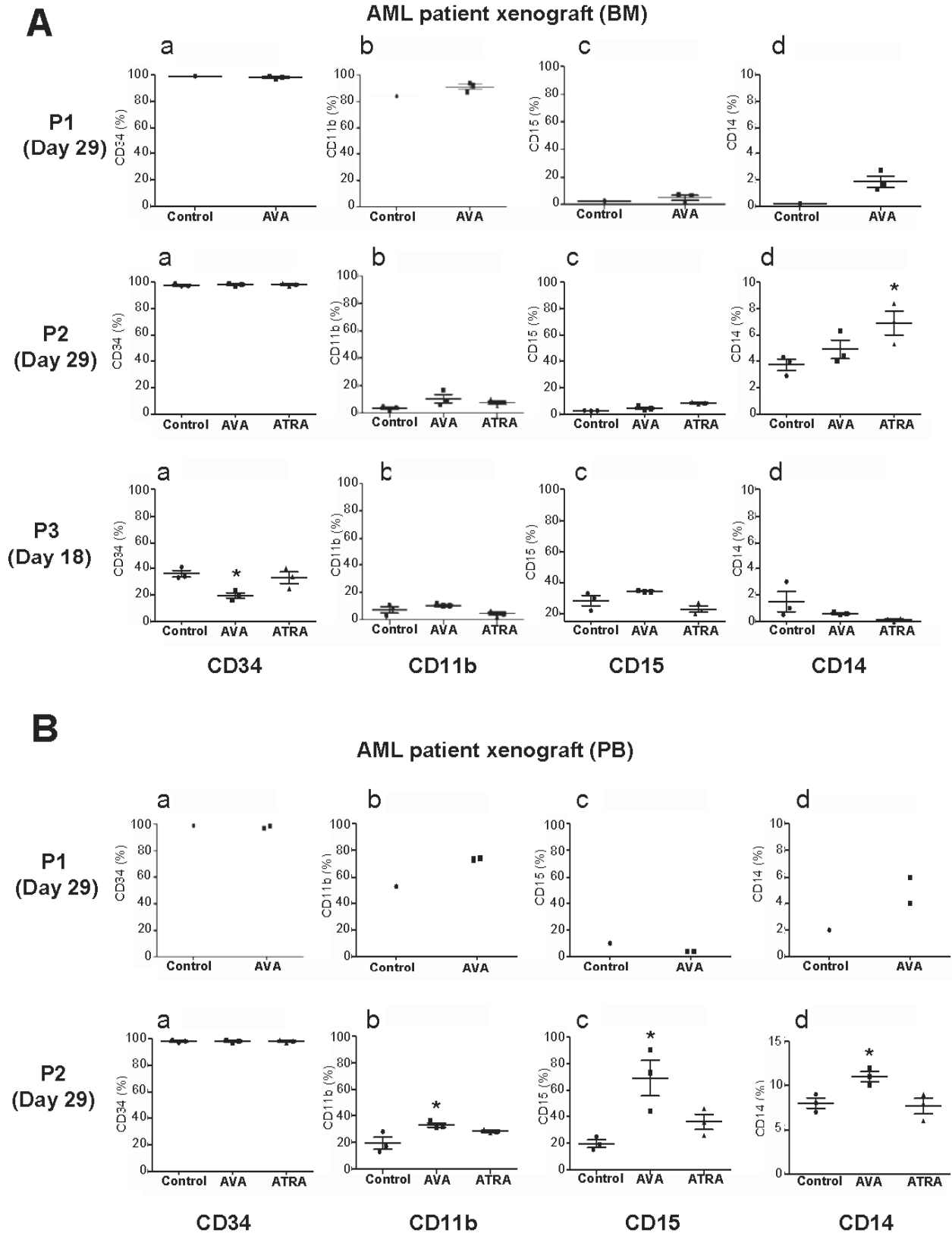


Figure 4 Phenotypic analysis of leukemic cells in the BM (A) and PB (B) of AML xenografts.

Partial responsive group: this group includes AML patient P2, P3 and P4 xenografts for whom partial effects of either AVA or ATRA alone were observed.

P2 AML: while the PB of the treated AML xenografts showed no modification in the percentage (Figure 3A P2a) or cell counts of hCD45 (Figure 3A P2b), the BM cells showed a significant ($*p \leq 0.05$) decrease in the percentages of hCD45 (Figure 3A P2c) and the absolute numbers (data not shown) suggesting a partial anti leukemic

effect of AVA and ATRA treatment. In line with this observation, a close analysis of the phenotype of hCD45+ cells in the PB showed at D18 an increase ($*p \leq 0.05$ and $^{\$}p \leq 0.01$ comparing control with AVA and ATRA, respectively) in the percentage of CD15+ (Figure 3B P2c) cells compared to control mice. Similar results were obtained at day 29 in BM (Fig 4A) or PB (Fig 4B). However, the persistence of CD34 expression supports only partial effects of treatment (Figure 3B P2a) and (Fig 4A and B) in this leukemia.

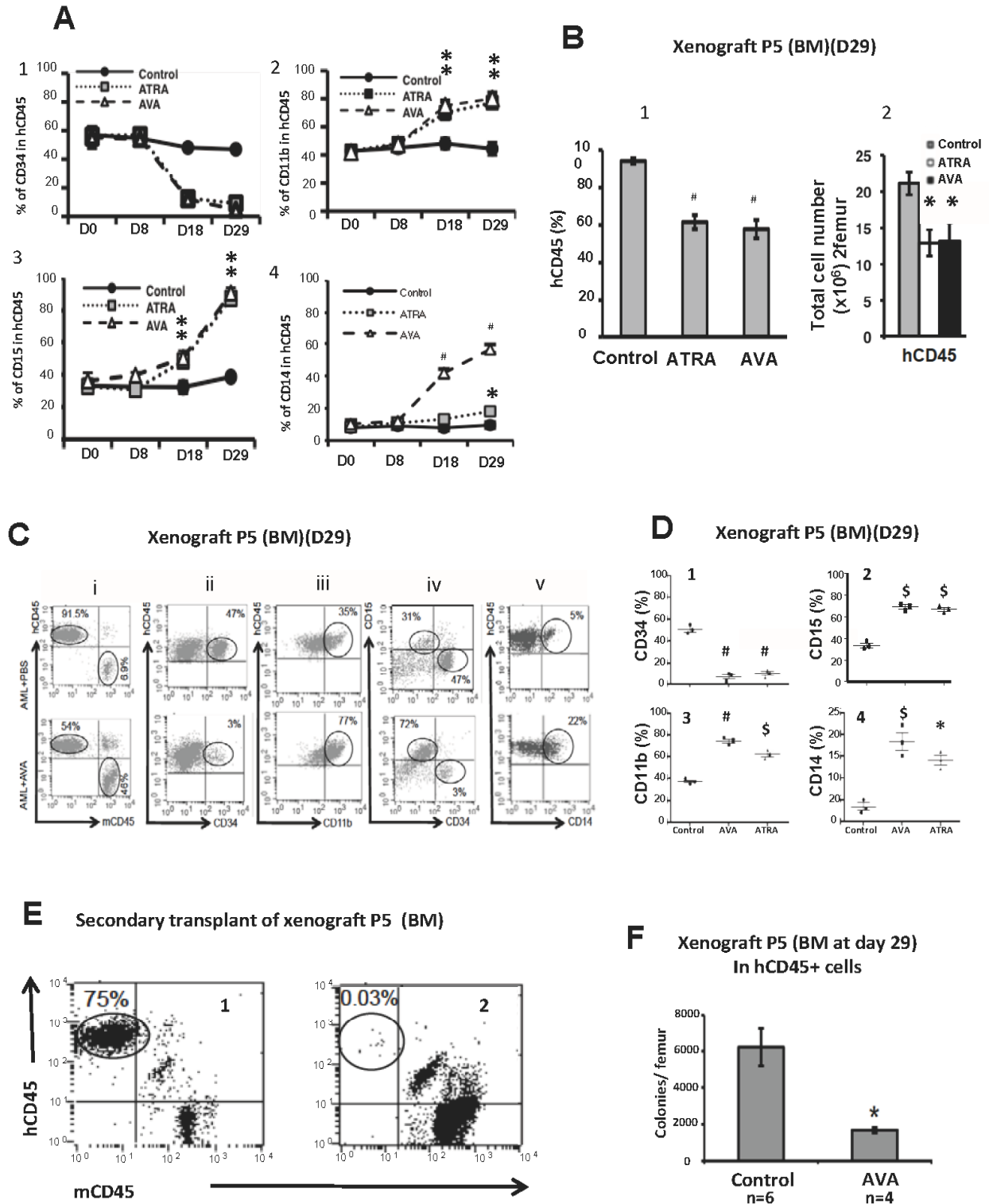


Figure 5 Potential therapeutic effect of AVA combination or ATRA in AML xenotransplantation mouse model (Responder Patient 5 AML xenograft).

P3 AML: Similar partial effects of AVA treatment were observed for P3 xenografts ($n=3$). Interestingly, for this patient, a sharp increase in the percentage of hCD45+ cells was observed in the PB (Figure 3A P3a) and BM (Figure 3A P3c) of AVA treated mice, while the percentage of CD34 expressing cells in hCD45+ population showed a decrease in PB (Figure 3B P3a) and BM (Fig 4A) of treated mice ($*p \leq 0.05$). This decrease is associated with an increase ($*p \leq 0.05$) in the percentage of cells expressing CD15 in the PB (Figure 3B P3c) with AVA treatment. These results suggest an increase in leukemic cell differentiation.

P4 AML: Partial effects of AVA treatment were also observed for P4 xenografts for which the percentage (Figure 3A, P4a) and the absolute number (Figure 3A, P4b) of hCD45+ cells was not modified in the PB by AVA treatment. However, phenotypic analysis of the hCD45+ cells in PB of treated mice showed a decrease tendency in the percentage of CD34 expressing (Figure 3B, P4a) associated with an increase tendency in the percentage of cells expressing CD11b and CD15 (Figure 3B, P4b, P4c).

Responsive Group: one AML xenograft (P5) showed complete antileukemic effects of AVA and ATRA associated with differentiation towards the monocytic lineage. A two fold decreased in the percentages (Figure 3A P5a, $\#p \leq 0.001$) and the absolute numbers (Figure 3A P5b, $*p \leq 0.05$) of hCD45+ cells in PB was detected upon either treatment. The percentage of leukemic cells in the BM (Figure 3A P5c) was correlated to that observed in PB. The anti leukemic effects of AVA and ATRA were accompanied by a parallel decrease ($\#p \leq 0.001$) in the percentage of CD34+ cells (Figure 3B P5a). Concomitantly, we observed an enhancement in the percentages of cells expressing markers of myeloid differentiation including CD11b (Figure 3B P5b), CD15 (Figure 3B P5c) and CD14 (Figure 3B P5d). Of note, an increase in the percentage of cells expressing the monocytic marker was noted with AVA ($\#p \leq 0.001$) and to a minor extent with ATRA ($*p \leq 0.001$) alone. Interestingly, the kinetics of cell differentiation of leukemic cells in the PB showed that changes in percentage of CD34+ (Figure 5A1), CD11b+ (Figure 5A2), CD15+ (Figure 5A3) and CD14+ (Figure 5A4) cells within the

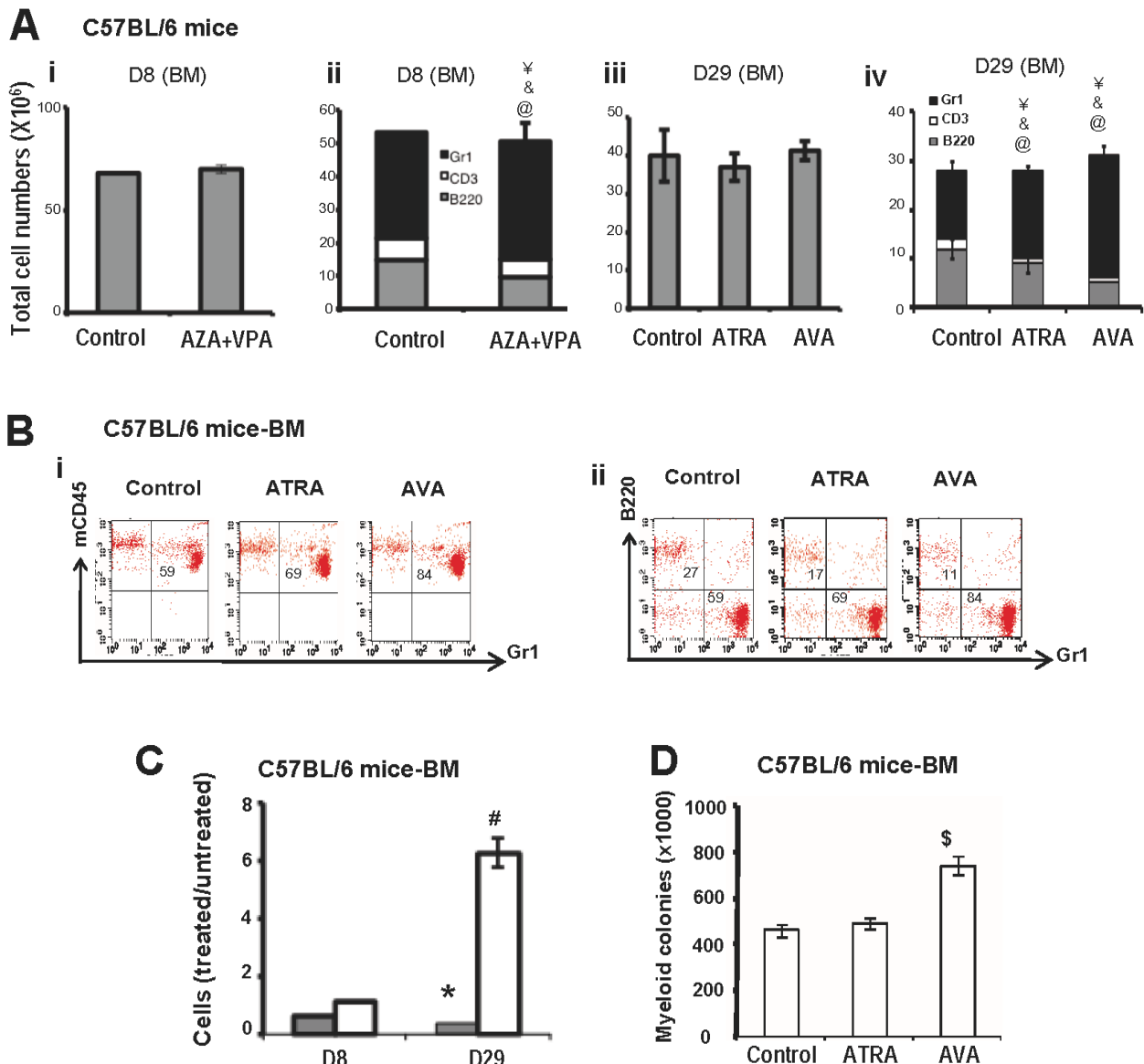


Figure 6 Effect of AZA, VPA and ATRA (AVA) combination therapy on C57BL/6 mouse normal hematopoiesis.

hCD45 population were detected as soon as day 18 indicating that the antileukemic effects of AVA and ATRA were relatively rapid (Figure 5A 1, 2, 3, 4). The impact of treatments in the BM of treated animals was determined at the time of sacrifice on day 29. We observed that the percentages (Figure 5B1, ($^{\#}p \leq 0.001$) and the absolute numbers (Figure 5B2, $^{*}p \leq 0.05$) of hCD45+ cells were decreased by almost two fold upon ATRA or AVA treatment. As illustrated in figure 5C, the percentages of leukemic cells (hCD45+) expressing the differentiation markers CD11b (Figure 5Ciii), CD15 (Figure 5Civ) and CD14 (Figure 5Cv) were increased while that of CD34+ cells was decreased (Figure 5Cii, iv). These results were observed for all the mice within each group (Figure 5D) and correlated to those observed in PB (Figure 3B P5). To further document the antileukemic effect of the AVA combination in this AML xenograft, hCD45+ cells from PBS and AVA treated mice were isolated from BM at day 29 and transplanted in secondary recipient mice. The percentage of leukemic cells in the PB (hCD45+) was monitored after 5 weeks. Leukemia engraftment in the secondary transplants was obtained in the recipient of PBS-treated mice (Figure 5E1) while hardly any hCD45+ leukemic cells were detected in the recipient of AVA treated mice (Figure 5E2). These *in vivo* data were corroborated by the reduction of leukemic myeloid colonies obtained from the hCD45 positive cells of AVA treated mice compared to the controls (Figure 5F).

To determine whether normal hematopoiesis could be altered by AVA combination in mice, C57BL/6 mice were treated with either

ATRA or AVA using the same protocol used for AML mice xenografts. As shown in figure 6A, upon 8 days treatment, the total number of BM cells was not modified. However, the distribution of myeloid and lymphoid cells was altered. Indeed, the B-lymphoid (B220⁺) and T-lymphoid (CD3⁺) cell numbers decreased and myeloid cell number (Gr1⁺) increased (Figure 6A, $^{\#}p \leq 0.01$, $^{*}p \leq 0.01$ and $^{@}p \leq 0.01$ for B220, CD3 and Gr1, respectively). At D29, AVA combination effect is even more prominent as illustrated in figure 6B with an important increase in Gr1 positive cells while B220 positive and CD3 positive cell numbers decreased (Figure 6B, 6C). The importance of AVA treatment was evaluated by calculating the AVA treated/untreated ratio of B-lymphoid (B220+) and myeloid (Gr1+). As shown in figure 6C, in AVA treated mice, the ratio for Gr1 was 1.6 at day 8 and reached more than 6 at day 29. To evaluate the effects of these treatments on more immature cells, bone marrow cells from mice treated for 29 days were plated in colony assay. We also observed that the numbers of myeloid colonies were superior ($^{\#}p \leq 0.01$) in the AVA group compared to ATRA alone or controls (Figure 6D). Thus, AVA combination alters the myeloid and lymphoid compartment but importantly spares immature progenitor cells.

Finally, the myeloid differentiation effect of the AVA combination was also investigated on human hematopoiesis in chimeric NOG mice (Figure 7). In these experiments, irradiated NOG mice were injected with human CD34⁺ cells from cord blood. Three months after injection, chimeric mice fully reconstituted with human hematopoietic cells were treated with AVA according to the protocol

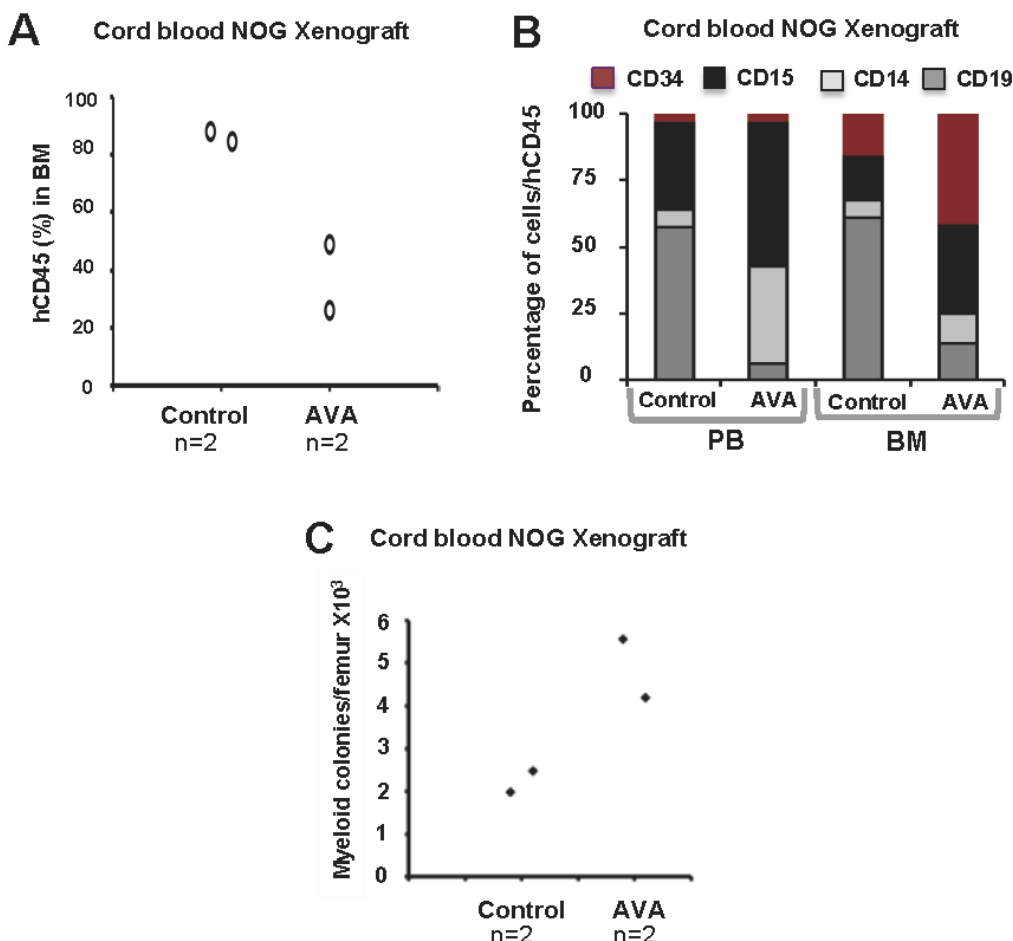


Figure 7 Effect of AVA treatment on normal human hematopoiesis in CD34+ cord blood NOG xenotransplanted mice at day 29.

described in figure 2A. Strikingly, AVA treatment of reconstituted mice resulted in a decrease in the percentage of human CD45 positive cells (Figure 7A). More comprehensive analysis using phenotypic markers of BM cells at day 29 of treatment revealed that AVA modified the distribution of myeloid and lymphoid cells with an increase in the percentage of B-lymphoid (CD19⁺) and an increase of CD15 and CD14 myeloid cells (Figure 7B). We also observed an increase in the percentage of immature CD34⁺ cells in BM treated mice. Consistent with this finding, increased human myeloid colonies were observed (Figure 7C) as already observed in normal C57BL/6 mice. Together, these results suggest that AVA treatment leads to a specific loss of lymphoid cells but spares myeloid cells and maintains immature CD34⁺ cells. Altogether, our results indicate that AVA treatment may induce leukemic cell differentiation at least in some selected patients while inducing only minor deleterious effects on normal hematopoiesis further strengthening the potential of these drugs for AML therapy. In the present study, we used drugs whose mechanisms of action are beginning to be known. Indeed, the best known mechanism of action of ATRA is through differentiation^[29], AZA is through DNA demethylation^[30] (Figure 1C) and VPA's action is through histone acetylation^[31-32] (Figure 1D). These modifications may lead to apoptosis and death of the leukemic cells^[29-32]. It remains to know why normal and leukemic cells respond differently to the same epigenetic signals.

In conclusion, our study has allowed establishing preclinical models to study combination therapy with epigenetic drugs. Several preclinical models to explore the effects of chemotherapeutic drugs are presently used. So far, most of the studies used well-characterized AML cell lines including OCF-AML2 cells^[33], U937 cells^[34], the RUNX1-mutated CG-SH AML line^[35] and AML1/ETO-positive Kasumi-1 cells^[36]. When inoculated in severe combined immunodeficient (SCID) mice, these cells produced leukemia that can be targeted using chemotherapeutic drugs. These *in vivo* leukemic models are also frequently used to evaluate the effect of gene modification and silencing. In our study, we choose to use primary AML cells from different AML subtypes (AML-M0, M2, M5), which represent the huge heterogeneity of AML disease. In line with this, level of each marker of differentiation is different between AML patient cells. In addition, AML samples are heterogeneous in their ability to engraft in immunodeficient mice with less than 50% of successful engraftment^[23,37]. This great heterogeneity may explain the variations in sensitivity to drugs. This is further illustrated by the well-known heterogeneity of responses of AML patients in clinical trials (Soriano *et al.*^[20], Raffoux *et al.*^[21]). Strikingly, our small cohort is able to replicate the heterogeneity of responses obtained in clinical trials. Thus, our models should allow testing other combinations of HDAC and DNMT inhibitors and identifying predictive biomarkers of response.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Cancéropôle Ile de France, Association de la Recherche Contre le Cancer, INSERM and Université Paris Diderot, Université Paris XI, Association Laurette Fugain, Association Cent pour Cent la vie, the Fondation Gustave Roussy, Fondation de France. Satyananda Patel was a recipient of a post-doctoral fellowship from Cancéropôle Ile de France. We thank members of the Gustave Roussy animal facility and the flow cytometry facility, Elisabeth Savariau of the photography laboratory of the Institute of Hematology. We are also grateful to M. Ito (Kawasaki, Japan) for the NOG mice.

Authorship: SP, YZ, FL performed research and analysed data; SP wrote the paper; AC, MMD, FZ and BC performed research and analyzed data; FL, CC designed research, analyzed the data and wrote the paper. All authors read, commented on and approved the final version of the manuscript.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. 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(7):730-737.
2. Cazzola, M., Della Porta, M.G., Malcovati, L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood.* 2013;122(25):4021-4034.
3. Herman, J.G., Baylin, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349(21):2042-2054.
4. Kitamura, K., Hoshi, S., Koike, M., Kiyoi, H., Saito, H., Naoe, T. Histone deacetylase inhibitor but not arsenic trioxide differentiates acute promyelocytic leukaemia cells with t(11;17) in combination with all-trans retinoic acid. *Br J Haematol.* 2000;108(4):696-702.
5. Greenblatt, S.M., Nimer, S.D. Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia. *Leukemia.* 2014;28(7):1396-1406.
6. Kelly, T.K., De Carvalho, D.D., Jones, P.A. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1069-1078.
7. Fenaux, P., Seymour, J.F., Santini, V., Silverman, L., Gore, S., List, A., Sanz, G., Mufti, G.J., Estey, E., Swern, A.S., Beach, C.L., Hellstrom-Linderberg, E. Challenges of phase III trial design for novel treatments in diseases with no standard treatment: the AZA-001 myelodysplasia study model. *Leuk Res.* 2014;38(2):258-262.
8. Jones, P.A., Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3(6):415-428.
9. Phiel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Klein, P.S. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem.* 2001;276(39):36734-36741.
10. Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G., Heinzl, T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 2001;20(24):6969-6978.
11. Kuendgen, A., Strupp, C., Aivado, M., Bernhardt, A., Hildebrandt, B., Haas, R., Germing, U., Gattermann, N. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood.* 2004;104(5):1266-1269.
12. Kuendgen, A., Schmid, M., Schlenk, R., Knipp, S., Hildebrandt, B., Steidl, C., Germing, U., Haas, R., Dohner, H., Gattermann, N. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2006;106(1):112-119.
13. Di Croce, L., Raker, V.A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., Minucci, S., Pelicci, P.G. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science.* 2002;295(5557):1079-1082.
14. Cote, S., Rosenauer, A., Bianchini, A., Seiter, K., Vandewiele, J., Nervi, C., Miller, W.H., Jr. Response to histone deacetylase inhibition of novel PML/RARalpha mutants detected in retinoic acid-resistant APL cells. *Blood.* 2002;100(7):2586-2596.

15. Cimino, G., Lo-Coco, F., Fenu, S., Travaglini, L., Finolezzi, E., Mancini, M., Nanni, M., Careddu, A., Fazi, F., Padula, F., Fiorini, R., Spiriti, M.A., Petti, M.C., Venditti, A., Amadori, S., Mandelli, F., Pelicci, P.G., Nervi, C. Sequential valproic acid/all-trans retinoic acid treatment reprograms differentiation in refractory and high-risk acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2006;66(17):8903-8911.
16. Yang, H., Hoshino, K., Sanchez-Gonzalez, B., Kantarjian, H., Garcio-Manero, G. Antileukemia activity of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid. *Leuk Res.* 2005;29(7):739-748.
17. Ahuja, N., Easwaran, H., Baylin, S.B. Harnessing the potential of epigenetic therapy to target solid tumors. *J Clin Invest.* 2014;124(1):56-63.
18. Cras, A., Politis, B., Balitrand, N., Darsin-Bettinger, D., Boelle, P.Y., Cassinat, B., Toubert, M.E., Chomienne, C. Bexarotene via CBP/p300 induces suppression of NF-kappaB-dependent cell growth and invasion in thyroid cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(2):442-453.
19. Kelly, W.K., O'Connor, O.A., Marks P.A. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002;11(12):1695-1713.
20. Soriano, A.O., Yang, H., Faderl, S., Estrov, Z., Giles, F., Ravandi, F., Cortes, J., Wierda, W.G., Ouzounian, S., Quezada, A., Pierce, S., Estey, E.H., Issa, J.P., Kantarjian, H.M., Garcia-Manero, G. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2007;110(7):2302-2308.
21. Raffoux, E., Cras, A., Recher, C., Boelle, P.Y., de Labarthe, A., Turlure, P., Marolleau, J.P., Reman, O., Gardin, C., Victor, M., Maury, S., Rousselot, P., Malfuson, J.V., Maarek, O., Daniel, M.T., Fenaux, P., Degos, L., Chomienne, C., Chevret, S., Dombret, H. Phase 2 clinical trial of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Oncotarget.* 2010;1(1):34-42.
22. Chomienne, C., Ballerini, P., Balitrand, N., Daniel, M.T., Fenaux, P., Castaigne, S., Degos L. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemias. II. *In vitro* studies: structure-function relationship. *Blood.* 1990;76(9):1710-1717.
23. Patel, S., Zhang, Y., Cassinat, B., Zassadowski, F., Ferre, N., Cuccuini, W., Cayuela, J.M., Fenaux, P., Bonnet, D., Chomienne, C., Louache, F. Successful xenografts of AML3 samples in immunodeficient NOD/shi-SCID IL2Rgamma(-/-) mice. *Leukemia.* 2012;26(11):2432-2435.
24. Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Keike, T., Nakahata, T. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: a n excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood.* 2002;100(9):3175-3182.
25. Ito, C.Y., Li, C.Y., Bernstein, A., Dick, J.E., Stanford, W.L. Hematopoietic stem cell and progenitor defects in Sca-1/Ly-6A-null mice. *Blood.* 2003;101(2):517-523.
26. Robert-Richard, E., Ged, C., Ortet, J., Santarelli, X., Lamrissi-Garcia, I., de Verneuil, H., Mazurier, F. Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice. *Haematologica.* 2006; 91(10):1384.
27. Feng, W.H., Kenney, S.C. Valproic acid enhances the efficacy of chemotherapy in EBV-positive tumors by increasing lytic viral gene expression. *Cancer Res.* 2006;66(17):8762-8769.
28. Zhang, Y., Patel, S., Abdelouahab, H., Witnner, M., Willekens, C., Shen, S., Betems, A., Joulin, V., Opolon, P., Bawa, O., Pasquier, F., Ito, M., Fujii, N., Gonin, P., Solary, E., Vainchenker, W., Coppo, P., De Botton, S., Louache, F. CXCR4 inhibitors selectively eliminate CXCR4-expressing human acute myeloid leukemia cells in NOG mouse model. *Cell Death Dis.* 2012;3:e396.
29. Schenk, T., Stengel, S., and Zelent, A. Unlocking the potential of retinoic acid in anticancer therapy. *Br J Cancer.* 2014; 111 (11), 2039-2045.
30. Estey, E.H. Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2013; 27(9), 1803-1812.
31. Bruserud, O., Reikvam, H., Fredly, H., Skavland, J., Hagen, K.M., van Hoang, T.T., Brenner, A.K., Kadi, A., Astori, A., Gjertsen, B.T., Pendino F (2015). Expression of the potential therapeutic target CXXC5 in primary acute myeloid leukemia cells - high expression is associated with adverse prognosis as well as altered intracellular signaling and transcriptional regulation. *Oncotarget.* 2015; 6(5), 2794-2811.
32. Oike, T., Ogiwara, H., Amornwichee, N., Nakano, T., and Kohno, T. Chromatin-regulating proteins as targets for cancer therapy. *J Radiat Res.* 2014; 55(4), 613-628.
33. Yeung, M., Hurren, R., Nemr, C., Wang, X., Hershenfeld, S., Gronda, M., Liyanage, S., Wu, Y., Augustine, J., Lee, E.A., Spagnuolo P.A., P.A., Southall N., Chen C., Zheng W., Jeyaraju D.V., Minden M.D., Laposa R., Schimmer A.D. Mitochondrial DNA damage by bleomycin induces AML cell death. *Apoptosis.* 2015; 20(6): 811-820.
34. Yang, L., Weng, W., Sun, Z.X., Fu, X.J., Ma, J., and Zhuang, W.F. SphK1 inhibitor II (SKI-II) inhibits acute myelogenous leukemia cell growth *In vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 460(4): 903-908.
35. Sivagnanalingam, U., Balys, M., Eberhardt, A., Wang, N., Myers, J.R., Ashton, J.M., Becker, M.W., Calvi, L.M., and Mandler, J.H. Residual Disease in a Novel Xenograft Model of RUNX1-Mutated, Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One.* 2015; 10(7): e0132375.
36. Wei, S., Wang, Y., Chai, Q., Fang, Q., Zhang, Y., and Wang, J. and effects of heme oxygenase-1 silencing on the survival of acute myelocytic leukemia-M2 cells. *Exp Ther Med.* 2015; 9(3): 931-940.
37. Taussig, D.C., Vargaftig, J., Miraki-Moud, F., Griessinger, E., Sharrock, K., Luke, T., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S.G., Lister T.A., Gribben J.G., Bonnet D. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood.* 2010; 115(10): 1976-1984.

Peer reviewer: Ratana Banjerdpongchai, M.D., Ph.D., Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

Article 4 en collaboration avec le laboratoire de biologie et physiologie animale, CNRS UMR 8113, Ecole Normale Supérieure de Cachan: « A new humanized in vivo model of KIT D816V+ advanced systemic mastocytosis monitored using a secreted luciferase ». Oncotarget, 2016.

Siham Bibi, Yanyan Zhang, Caroline Hugonin, Mallorie Depond Mangan, Liang He, Ghaith Wedeh, Jean-Marie Launay, Sjoerd Van Rijn, Thomas Würdinger, Fawzia Louache, Michel Arock.

A new humanized *in vivo* model of *KIT* D816V⁺ advanced systemic mastocytosis monitored using a secreted luciferase

Siham Bibi¹, Yanyan Zhang², Caroline Hugonin¹, Mallorie Depond Mangan², Liang He², Ghaith Wedeh¹, Jean-Marie Launay³, Sjoerd Van Rijn⁴, Thomas Würdinger^{4,5}, Fawzia Louache², Michel Arock^{1,6}

¹Molecular and Cellular Oncology Research Group, LBPA CNRS UMR 8113, Ecole Normale Supérieure de Cachan, Cachan, France

²INSERM Unit U1170, Hématopoïèse normale et pathologique, Gustave Roussy Campus, Université Paris Sud Villejuif, France

³Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Inserm U942, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Université Paris Diderot - Paris VII Paris, France

⁴Neuro-oncology Research Group, Department of Neurosurgery, Cancer Center Amsterdam, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

⁵Neuroscience Center, Department of Neurology, Massachusetts General Hospital and Neuroscience Program, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

⁶Laboratoire Central d'Hématologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris VI, Paris, France

Correspondence to: Siham Bibi, **email:** sbibi@ens-cachan.fr/syham_bibi@hotmail.com

Keywords: *KIT* D816V mutant, *ROSA*^{*KIT* D816V} cell line, gluc reporter, NSG mice, advanced systemic mastocytosis

Received: August 08, 2016

Accepted: October 12, 2016

Published: October 22, 2016

ABSTRACT

Systemic mastocytosis are rare neoplasms characterized by accumulation of mast cells in at least one internal organ. The majority of systemic mastocytosis patients carry *KIT* D816V mutation, which activates constitutively the *KIT* receptor. Patient with advanced forms of systemic mastocytosis, such as aggressive systemic mastocytosis or mast cell leukemia, are poorly treated to date. Unfortunately, the lack of *in vivo* models reflecting *KIT* D816V⁺ advanced disease hampers pathophysiological studies and preclinical development of new therapies for such patients. Here, we describe a new *in vivo* model of *KIT* D816V⁺ advanced systemic mastocytosis developed by transplantation of the human *ROSA*^{*KIT* D816V-Gluc} mast cell line in NOD-SCID IL-2R $\gamma^{-/-}$ mice, using *Gaussia princeps* luciferase as a reporter. Intravenous injection of *ROSA*^{*KIT* D816V-Gluc} cells led, in 4 weeks, to engraftment in all injected primary recipient mice. Engrafted cells were found at high levels in bone marrow, and at lower levels in spleen, liver and peripheral blood. Disease progression was easily monitored by repeated quantification of *Gaussia princeps* luciferase activity in peripheral blood. This quantification evidenced a linear relationship between the number of cells injected and the neoplastic mast cell burden in mice. Interestingly, the secondary transplantation of *ROSA*^{*KIT* D816V-Gluc} cells increased their engraftment capability. To conclude, this new *in vivo* model mimics at the best the features of human *KIT* D816V⁺ advanced systemic mastocytosis. In addition, it is a unique and convenient tool to study the kinetics of the disease and the potential *in vivo* activity of new drugs targeting neoplastic mast cells.

INTRODUCTION

Human mast cells (MCs) are non-circulating, tissue-resident cells derived from CD34⁺ hematopoietic stem cells in the bone marrow (BM) [1]. Mature MCs are found in most vascularized organs, surrounding blood vessels and nerves [2]. MC and their progenitors express

the receptor for stem cell factor (SCF), *KIT* (CD117), a transmembrane type III tyrosine kinase receptor (RTK) [3]. Binding of SCF to *KIT* governs most if not all the aspects of human MC biology, from proliferation to differentiation, migration, activation and survival [4, 5].

Mastocytosis are a heterogeneous group of diseases characterized by accumulation of abnormal (neoplastic)

MCs in one or several organs, affecting both children and adults [6]. In adults, most patients present with a systemic involvement (systemic mastocytosis; SM). According to the World Health Organization (WHO), SM is classified into four major categories. Indolent SM (ISM) has a good prognosis, usually requires only symptomatic therapies, and ISM patients have a nearly normal life expectancy [6, 7]. The three other categories, collectively termed advanced SM, share a poor prognosis. Advanced SM categories include SM with an associated hematologic neoplasm (SM-AHN), aggressive SM (ASM), and MC leukemia (MCL) [8]. All categories of SM are characterized by an accumulation of abnormal MCs in BM and in other extra-cutaneous organs [9, 10].

WHO criteria for the diagnosis of SM include one major criterion and four minor criteria. The diagnosis of SM is established if at least the major and one minor criterion or at least three minor criteria are fulfilled [8, 11]. The major diagnostic criterion is defined by the presence of aggregates of at least 15 MCs identified by tryptase staining in BM and/or other extra-cutaneous organ biopsies. Minor criteria are: i) presence of 25% MCs with atypical morphology in BM smears [12], ii) aberrant immunophenotype of MCs (expression of CD2 and/or CD25) [13], iii) presence of an activating point mutation in codon 816 of the *KIT* gene in BM, peripheral blood (PB) or other extracutaneous organs [14, 15], and iv) increased level of serum tryptase (> 20 ng/mL) [16]. If SM is diagnosed, the next step is to evaluate its aggressiveness according to the presence of B-findings (borderline benign) and C-finding (consider cytoreduction). B- and C-findings correspond respectively to high MC burden and to organ dysfunction leading to the use of cytoreductive therapy [7]. The absence of B- and C-findings reflects an ISM [6, 7]. By contrast, the presence of at least one C-finding directs the diagnosis towards an advanced form of SM (ASM, SM-AHN or MCL). ASM is diagnosed when MCs in BM smears represent less than 20% of total nucleated cells [8, 17]. MCL is diagnosed when MCs in BM smears represent > 20% of total nucleated cells (with or without circulating neoplastic MCs in the bloodstream) [8, 17].

KIT is crucially involved in the pathophysiology of SM as the majority of patients carry *KIT* mutations, notably *KIT* D816V [18]. This mutation, found in > 85% of all patients with SM, activates constitutively *KIT* [15]. Activated *KIT* induces sustained proliferative and anti-apoptotic signaling in neoplastic MCs [18]. This *KIT* mutant receptor is resistant to most type I tyrosine kinase inhibitors (TKIs) targeting the wild-type receptor (*KIT* WT), such as imatinib [19]. By contrast, the mutant is sensitive to multikinase inhibitors such as midostaurin (PKC412) [20]. Thus, midostaurin is currently under clinical trials to treat Advanced SM [21]. However, this drug seems not sufficient to induce long-lasting complete responses in ASM and MCL [21]. There is thus a need to identify novel therapies for these diseases. To this purpose, relevant preclinical *in vivo* models of SM may be very useful. Unfortunately, the

present lack of *in vivo* models mimicking at the best human *KIT* D816V⁺ advanced SM hampers pathophysiological studies and the development of new therapeutics. Only a few mouse models have been previously developed. In 2005, Zappulla *et al.* described a transgenic murine model using the primate chymase promoter as a driver of human *KIT* D816V mutation [22]. The authors reported the development of a SM-like disease within 12 to 24 months in only 30% of transgenic mice [22]. A few years after, Gerbaulet *et al.* described another transgenic mouse model expressing *kit* D814V mutation (murine homolog to human *KIT* D816V) [23]. However, this model has a limited utility because of the variety of diseases observed, ranging from perinatal lethality to pure MC hyperplasia, and of a very long period of latency (52 weeks) [23]. Besides, two xenograft mouse models have been described: one consisted in the injection of the leukemic HMC-1.2 cell line in SCID mice, giving rise to solid tumors [24], while the second consisted in injecting P815 mastocytoma cells in DBA-2 mice [25]. In this latter model, a severe mortality was observed within 9 days in injected animals [25]. These models are not useful for preclinical studies because of drawbacks such as the low incidence of disease and/or the kinetic of disease appearance and progression, which is either very short or too long. Thus, to date, no relevant *in vivo* models of *KIT* D816V⁺ advanced SM are available. In addition, none of the existing models allows monitoring of disease progression in real time.

We have recently reported on a new tumorigenic *KIT* D816V⁺ human MC line, termed ROSA^{*KIT* D816V}, which presents most of the characteristics of neoplastic MCs found in ASM/MCL [26]. ROSA^{*KIT* D816V} cell line was obtained by stable lentiviral transfection of a construct encoding for the *KIT* D816V mutant gene in the parental, non tumorigenic human mast cell line, ROSA *KIT* wild-type (ROSA^{*KIT* WT}) [26]. In the present study, we have stably transduced ROSA^{*KIT* D816V} cells with a construct encoding the naturally secreted *Gaussia princeps* luciferase (Gluc). This allowed us to obtain a new human neoplastic MC line, termed ROSA^{*KIT* D816V-Gluc}. Gluc reporter is a highly sensitive luciferase allowing simultaneously the quantification of cells engraftment by measuring its activity in peripheral blood (PB) and *in vivo* imaging system (IVIS) [27]. ROSA^{*KIT* D816V-Gluc} cells were then injected in NOD-SCID IL-2R $\gamma^{-/-}$ (NSG) mice, giving rise to a unique humanized *in vivo* model of *KIT* D816V⁺ advanced SM. In this model, disease progression and localization of neoplastic MCs were monitored *in vivo* and *ex vivo* using Gluc as a reporter [27].

RESULTS

Generation and characterization of ROSA^{*KIT* D816V-Gluc} cells secreting luciferase

We transduced the human ROSA^{*KIT* D816V} MC line stably expressing the *KIT* D816V mutant and GFP [26] with a lentiviral vector expressing Gluc and CFP, *LV-*

Gluc-CFP. Cells expressing Gluc ($ROSA^{KIT D816V-Gluc}$ cells) were sorted by selection of GFP^+/CFP^+ cells (Figure 1A) and cultured in the same medium than their parental cell line. As shown in Figure 1B, the introduction of the lentiviral vector expressing Gluc and CFP into $ROSA^{KIT D816V}$ cells did not induce a significant change in their proliferation rate. In addition, the transduction did not change the phenotypic characteristics of the cells, as evidenced by the similar morphology of $ROSA^{KIT D816V}$ and $ROSA^{KIT D816V-Gluc}$ cells when observed on cytospin preparation after May Grünwald Giemsa (MGG) staining (Figure 1C). In addition, both cell lines expressed equally KIT (CD117) (Figure 1D). Besides, allele specific RT-PCR experiments confirmed that the two MC lines expressed the *KIT* D816V mutant at the same level (Figure 2A). Of note, as already described for $ROSA^{KIT D816V}$ cells [26], the KIT receptor was constitutively phosphorylated in

$ROSA^{KIT D816V-Gluc}$ cells in the absence of SCF (Figure 2B). This level of phosphorylation was comparable in the two *KIT* D816V⁺ MC lines, and slightly higher in $ROSA^{KIT WT}$ cells stimulated by SCF (Figure 2B). We then determined the level of Gluc activity in the cell-free supernatants of both *KIT* D816V⁺ cell lines cultured at various concentrations, using the Gluc substrate coelenterazine (CTZ). Gluc activity was detected at a significant level in $ROSA^{KIT D816V-Gluc}$ cells supernatants after 24h of incubation, even at low cell concentrations (10^2 cells per mL). As expected, there was no Gluc activity detectable in $ROSA^{KIT D816V}$ cell supernatants, at any cell concentration (Figure 2C). Moreover, we observed that increasing the number of $ROSA^{KIT D816V-Gluc}$ cells increased Gluc activity in a virtually linear manner (Figure 2C). Finally, in order to demonstrate that the transduction of by *LV-Gluc-CFP* did not change the sensitivity of the cells to TKIs, we

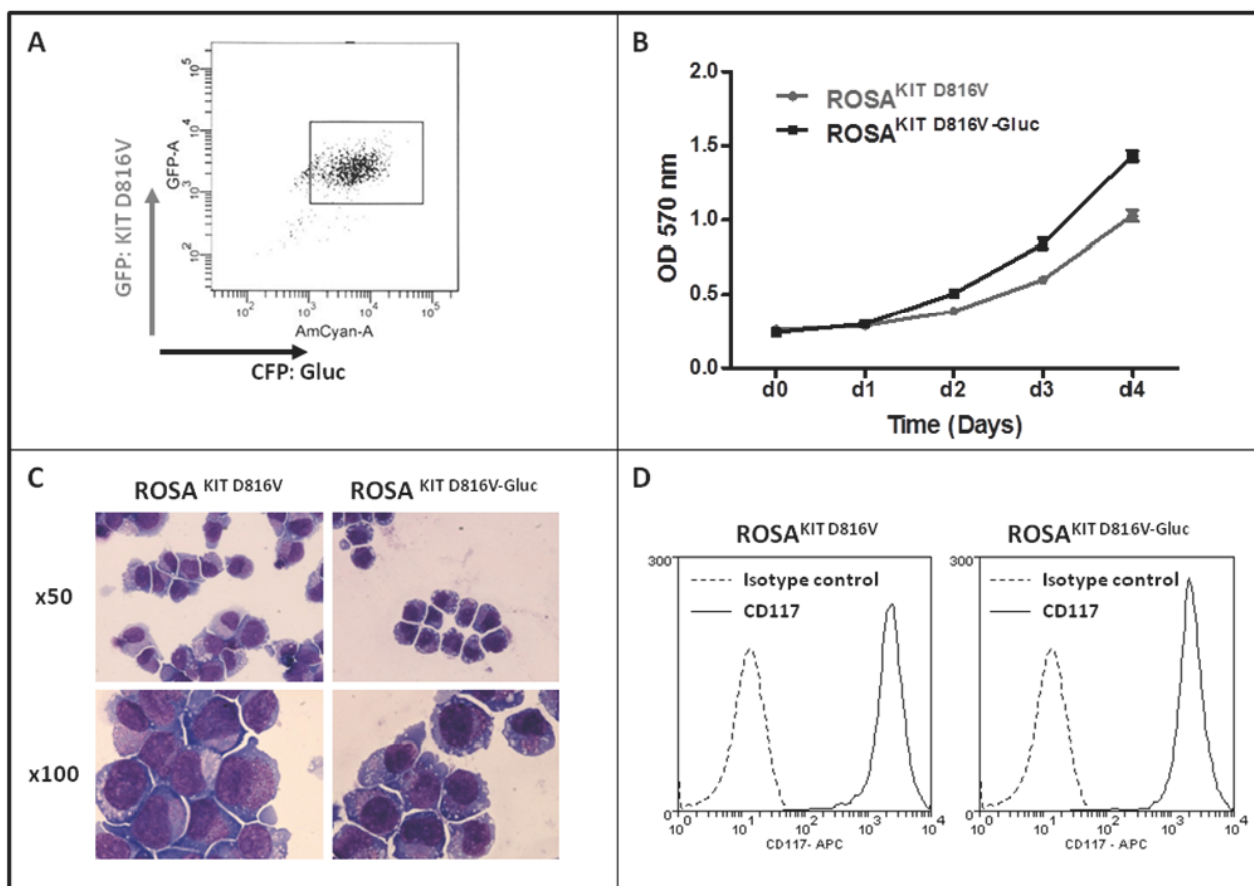


Figure 1: Generation of $ROSA^{KIT D816V-Gluc}$ cell line and comparison with the parental $ROSA^{KIT D816V}$ cell line. A. $ROSA^{KIT D816V-Gluc}$ GFP^+/CFP^+ sorted cells using flow cytometry. B. Comparison of $ROSA^{KIT D816V}$ and $ROSA^{KIT D816V-Gluc}$ cell proliferation by the use of the MTT method. Cells were seeded in 96-well plate for 5 days (1 plate/day). At each day (d0 - d4), 20 μ L of MTT were added in each well and the cells were incubated for 3 additional hours at 37°C. After adding 100 μ L of acidified isopropanol, the number of living cells was measured for each condition by reading the absorbance at 570 nm. Data are presented as the mean \pm SD (n = 3). C. Phenotypic comparison of the cytological aspect of $ROSA^{KIT D816V}$ and $ROSA^{KIT D816V-Gluc}$. MGG-stained cytospin preparations of $ROSA^{KIT D816V}$ (left panel) and $ROSA^{KIT D816V-Gluc}$ (right panel). Magnification is x50 (top), x100 (bottom). D. Comparative expression of CD117 (KIT) by in $ROSA^{KIT D816V}$ (left) and $ROSA^{KIT D816V-Gluc}$ (right) analyzed by flow cytometry.

assessed the effects of Imatinib or of Midostaurin on the proliferation of both *KIT* D816V⁺ cell lines. As expected, both cell lines were equally resistant to Imatinib (Figure 2D) and similarly sensitive to the antiproliferative effects of Midostaurin. The IC₅₀ for Midostaurin was found at 70 nM for ROSA^{KIT D816V} cells and at 94 nM for ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells (Figure 2E).

Analysis of the level of engraftment of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells *in vivo* in NSG mice

Various amounts of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells were injected intravenously in irradiated NSG mice. We then measured Gluc activity in the plasma of grafted mouse

four, eight and ten weeks after cell injection. Interestingly, at 4 weeks of engraftment, the Gluc activity in plasma was found linearly increased in relationship with increasing numbers of injected cells ($R^2 = 0.97$) (Figure 3A). However, although Gluc activity increased in a time-dependent manner, there was no apparent difference between groups injected with 5×10^6 or 10×10^6 cells at 8 and 10 weeks (Figure 3A). Compared with the level of Gluc activity determined in plasma, Gluc intensity measured after 10 weeks of engraftment by IVIS was found heterogeneous among groups, particularly in the groups injected with 5×10^6 or 10×10^6 cells at 10 weeks (Figure 3B and 3C).

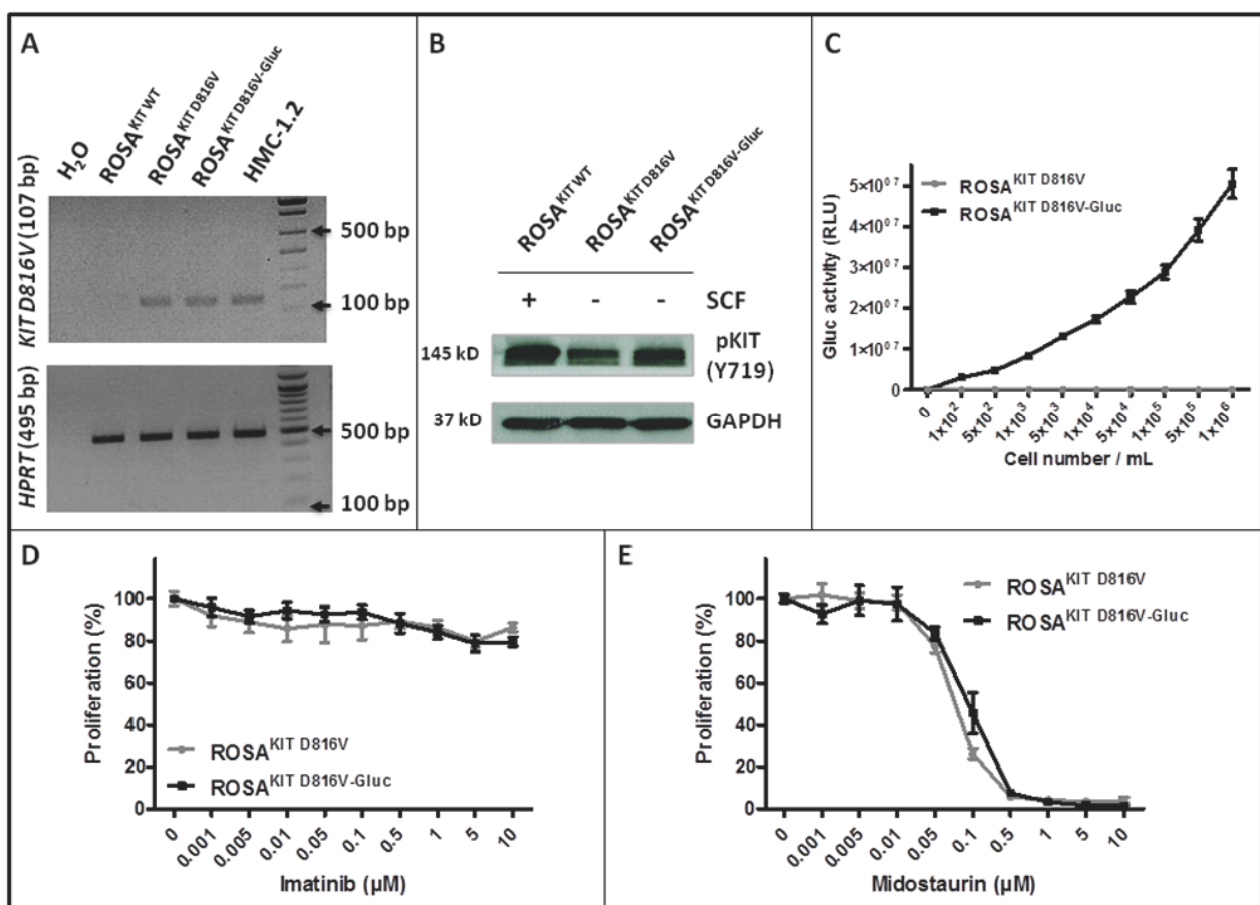


Figure 2: Effects of transduction of ROSA^{KIT D816V} cells with LV-Gluc-CFP on KIT activation and response to TKIs. A. Analysis of *KIT* D816V gene expression in ROSA^{KIT D816V-Gluc} cell line using agarose gel electrophoresis of conventional RT-PCR products. Reactions were compared to the levels of expression of mRNA for HPRT. The image is an inverted form of the original picture. **B.** Detection of spontaneous phosphorylation of KIT receptor by western blotting in ROSA^{KIT D816V-Gluc}. Cell lysates from ROSA^{KIT WT} cells stimulated with SCF, or from unstimulated ROSA^{KIT D816V} and ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells, were subjected to electrophoresis and stained with antibody against p-KIT Y719. An anti-human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. The lanes were run on the same gel. **C.** Gluc activity in cell culture supernatants of ROSA^{KIT D816V} (grey line) and ROSA^{KIT D816V-Gluc} (black line). Signals were calculated as RLU; relative luminescent units. Data present the mean ± SD (n = 3). **D, E.** Effect of Imatinib or Midostaurin on the proliferation of ROSA^{KIT D816V} (grey line) and ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells (black line). Each cell lines were seeded for 72h in 96-well plate in the presence of various concentrations (0.001 - 10 μM) of Imatinib (D) or Midostaurin (E). Data are presented as the mean ± SD (n = 3) and are expressed as percent of proliferation in each condition relative to the control (untreated cells) considered as 100% proliferation.

To further investigate the disease progression in the three groups of xenografted mice, PB samples were analyzed for the presence of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells by quantifying the percentage of hCD45⁺/hCD117⁺ cells using flow cytometry. The percentage of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in PB was found very low at 4 weeks (around 0.007 % in the 1x10⁶ cells group, 0.12 % in the 5x10⁶ cells group and 0.17% in the 10x10⁶ cells group). This percentage increased at 10 weeks in a dose (slightly > 0.45% in the 1x10⁶ cells group, > 1 % in the 5x10⁶ cells group and 1.5 % in the 10x10⁶ cells group at 10 weeks) and time-dependent manner (Figure 4A). The same phenomenon was observed when calculating the absolute numbers of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in PB at different time periods and after injection of different numbers of cells (Table 1).

Engraftment of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells *in vivo* in NSG mice leads to an advanced SM phenotype

To evaluate the level of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells engraftment in BM and spleen, thus the severity of the disease, mice (n=3 per group) were euthanized in each group 10 weeks after engraftment. BM cells were counted and the percentage of hCD45⁺/CD117⁺ cells was determined in each group. As expected, and in line with the human situation for ASM/MCL, the percentage of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in BM was found much higher (around 22 %) than in spleen (1.1 %) and in PB (1.0 %). There was no difference in cell percentages between the three groups of mice in BM as well as in spleen (Figure 4B and 4C, respectively) and this was confirmed by calculation of the absolute number of ROSA^{KIT D816V-Gluc}

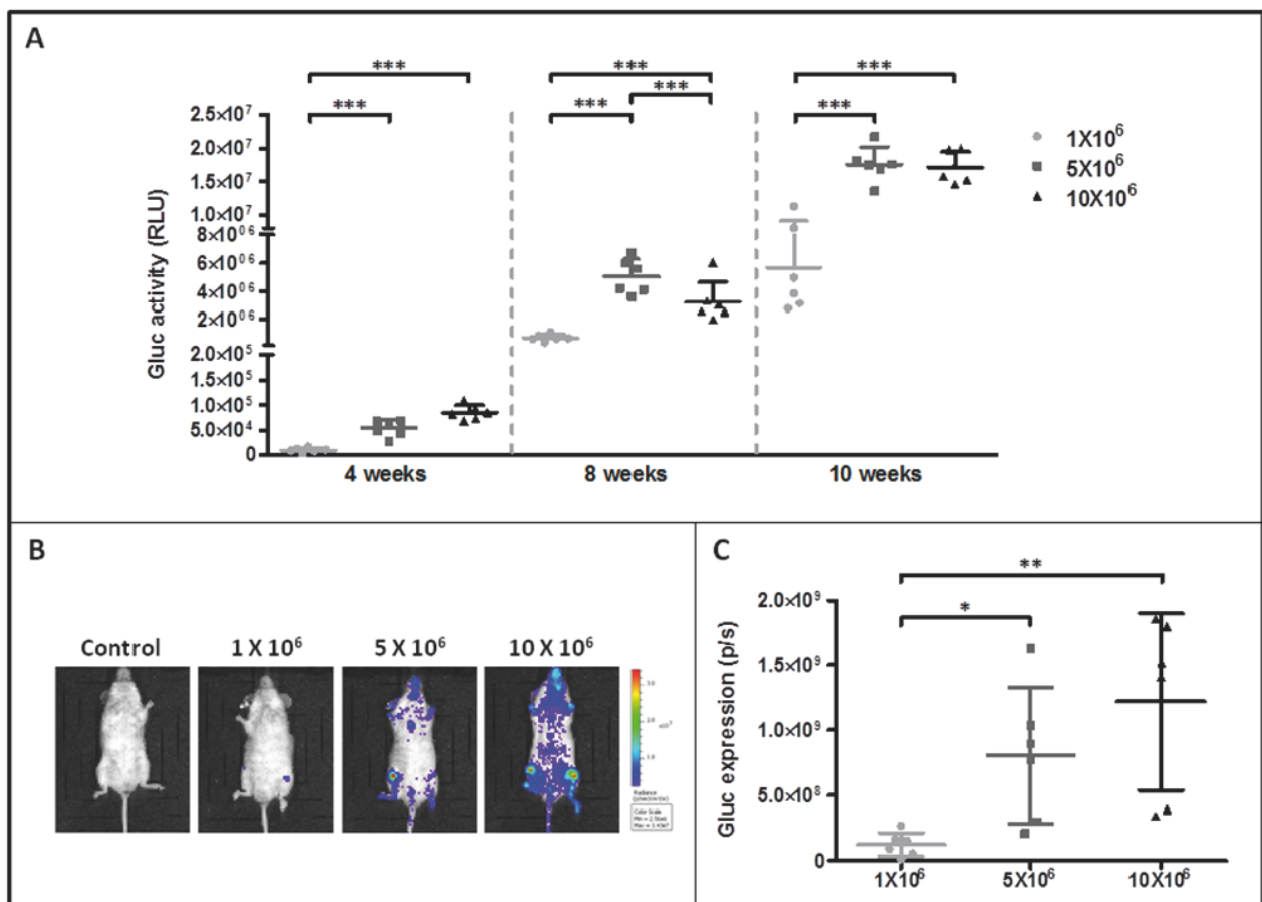


Figure 3: Monitoring of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells engraftment in injected mice by measurement of Gluc activity in blood and by IVIS. A. Gluc activity in plasma of mice after various times of engraftment. Different numbers of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells [1x10⁶ (●), 5x10⁶ (■) and 10x10⁶ (▲)] were injected intravenously in mice and engraftment was monitored over time (4, 8 and 10 weeks). Each point represents an individual mouse. B. IVIS showing localization of Gluc in injected mice after 10 weeks. Indicated numbers of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells were IV injected in mice (n = 6). Units in rainbow color scales are photons per second per cm² per steradian (p/sec/cm²/sr). Results shown are from one representative mouse for each group. C. Total relative units (RLU) per second were calculated for Gluc intensity shown in (B) by ROI analysis after 10 weeks of engraftment in the three groups of mice. Each point represents an individual mouse.

Table 1: Absolute numbers of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in PB of NSG mice injected with different amounts of cells

Groups	ROSA ^{KIT D816V-Gluc} cell number in PB (x10 ⁶ /mL)		
	4 weeks	8 weeks	10 weeks
1x10 ⁶ (n=6)	0	0.006 ± 0.004	0.012 ± 0.004
5x10 ⁶ (n=6)	0.004 ± 0.001 ***	0.021 ± 0.007*	0.025 ± 0.009*
10x10 ⁶ (n=6)	0.003 ± 0.001 ***	0.042 ± 0.013 ***	0.039 ± 0.017*

Data are presented as mean ± SD and paired t-test was performed in comparison to the group receiving 1x10⁶ cells.

Gluc cells in affected tissues (Table 2). Interestingly, the percentage of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in BM reached a plateau at 10 weeks regardless the number of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells injected (Figure 4B and Table 2). All in all, the high percentages of neoplastic MCs found in BM, together with a moderate infiltration of the spleen and of the PB, might indicate that diseased animals suffer of a pathology similar to an aleukemic MCL, as observed in some human patients [28].

We then studied in detail the organs engrafted by ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells, using immunohistochemical (IHC) staining with antibodies directed against human tryptase and human CD45. Analysis of BM sections of mice euthanized at 10 weeks revealed the presence of fibrosis, especially in the group injected with 10x10⁶ cells, as well as the presence of large clusters of tryptase and hCD45 positive cells (Figure 5), consistent with the pathological appearance of BM biopsies in human patients with advanced SM [29]. Whatsoever, tryptase⁺ and hCD45⁺ cells were detected at a high level in BM sections but in a lower extent in spleen (Figure 6A) and liver sections (Figure 6B). In the last two organs, a few clusters of MCs and isolated MCs were observed in all the organ sections (Figure 6A and 6B).

To further confirm the relevance of our *in vivo* model of SM towards the human pathology, we measured serum human tryptase levels in PB of xenotransplanted animals at 10 weeks. Consistent with the observation that tryptase serum levels are elevated in SM patients [30], significant levels of human tryptase (ranging from > 7.0 to > 11.0 µg/L) were measured in all xenotransplanted mice compared to the negative control, where the level of tryptase was found undetectable (< 1 µg/L) (Table 3). Interestingly, increased levels of serum tryptase paralleled increased numbers of cells injected at the beginning of the experiments (Table 3).

Finally, after 12 weeks of transplantation, signs of health deterioration appeared in mice injected respectively with 5x10⁶ or 10x10⁶ ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells, such as a decrease in water and food consumption accompanied with bristly hair, prostration and paralysis. This clinical phenotype further confirmed that the mice suffered from an aggressive form of the disease.

Xeno-transplanted ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells have enhanced grafting capabilities

In order to appreciate if ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells were able to retain their grafting capabilities in a secondary transplant model, we grafted naive irradiated animals with a low number of human cells purified from the BM of previously xenotransplanted mice. Five weeks after the secondary transplantation, the efficacy of engraftment was assessed by measurement of Gluc activity in plasma, assessment of whole body by IVIS, and by measurement of the percentage of hCD45⁺/hCD117⁺ cells in PB. As previously seen in the experiments of first transplantation, we observed that Gluc activity increased in a time-dependent manner in the plasma (Figure 7A). In addition, as compared to non-injected control mouse, Gluc was detected by IVIS as soon as 5 weeks following the xenotransplantation in the majority of the mice injected with previously engrafted ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells. The bioluminescence was found localized mainly in femur and feet (Figure 7B). Of note, after 9 weeks of secondary transplantation, Gluc expression was considerably increased when measured by IVIS (Figure 7B). Interestingly, in mice xenografted with pre-transplanted ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells, the percentage of hCD45⁺/hCD117⁺ cells in PB, as well as the level of Gluc activity, were found greater after the secondary transplantation of 5x10⁵ cells than after the primary transplantation of 10x10⁶ cells, suggesting that the first transplantation selected more “mice adapted” neoplastic MCs.

To evaluate more precisely the progression of the disease in the mice injected with previously transplanted cells, we measured the percentage of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in PB, BM and spleen after 5, 7, 8 and 9 weeks of secondary transplantation through the quantification of hCD45⁺/hCD117⁺ cells by flow cytometry. We observed that the percentage of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in PB increased significantly in a time-dependent manner (Figure 7C). Besides, at 9-weeks period of engraftment, the percentage of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells was found much higher in BM (around 35 %) than in spleen (around 1.5 %) or in PB (1.5 %) (Figure 7D). This observation was confirmed after IHC staining of human CD45 in BM,

spleen, and liver (Figure 8). Finally, to confirm that secondary transplantation of the human *KIT* D816V⁺ MC line did not alter the expression of the mutant *KIT* gene, we explored the expression of *KIT* D816V mutant on BM cells of secondary transplanted mice using allele-specific RT-PCR. As shown on Figure 9A, BM cells of the two injected mice expressed the *KIT* D816V mutant, exactly as did the ROSA^{KITD816V} cell line. As expected, no expression of the *KIT* mutant was detected in control, *KIT* mutant-negative ROSA^{KIT^{WT}} cells (Figure 9A).

Xenotransplanted ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells have advanced SM-like alterations in signaling pathways

In *KIT* D816V⁺ neoplastic MCs found in the BM of SM patients, and particularly those with advanced SM, *KIT* is found spontaneously activated, but also

other intracellular substrates are aberrantly activated (phosphorylated), such as signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), AKT and extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) [31, 32]. Those signaling molecules have been found increasingly phosphorylated in parallel with the aggressiveness of the disease and resistance of the neoplastic MCs to TKIs [31, 32]. To further confirm the similarity of our *in vivo* model of *KIT* D816V⁺ advanced SM with the human situation, we analyzed the spontaneous phosphorylation state of *KIT*, STAT5, AKT and ERK in BM cells isolated from secondary injected mice, as compared to the ROSA^{KITD816V} parental cell line. As shown in Figure 9B, the constitutive activation of the *KIT* receptor was accompanied by aberrant phosphorylation of *KIT*-downstream signaling pathways such as AKT, STAT5 and ERK. These findings are consistent with those reported for neoplastic MCs in advanced SM patients [31].

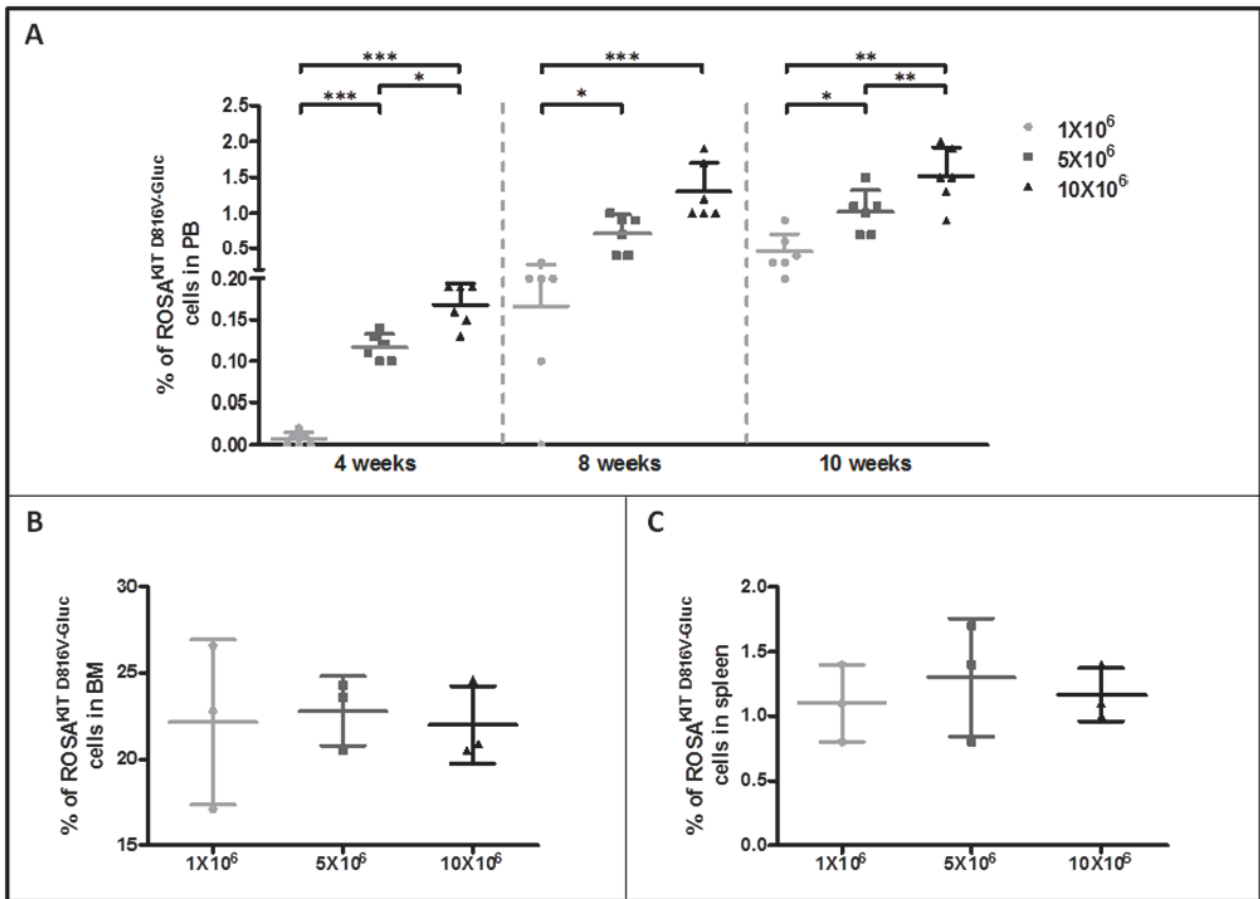


Figure 4: Evaluation of ROSA^{KITD816V-Gluc} cells numbers by flow cytometry in peripheral blood, bone marrow and spleen. A. Percentage of ROSA^{KITD816V-Gluc} cells in PB after increasing times of engraftment (4, 8 and 10 weeks). The percentage of ROSA^{KITD816V-Gluc} cells was determined in the three groups of mice: 1x10⁶ (●), 5x10⁶ (■) and 10x10⁶ (▲) by flow cytometry using monoclonal antibodies against human CD45 and human CD117. B, C. Percentages of ROSA^{KITD816V-Gluc} cells after 10 weeks of engraftment in BM and spleen respectively in the three groups of mice: 1x10⁶ (●), 5x10⁶ (■) and 10x10⁶ (▲). Each point represents an individual mouse.

Table 2: Absolute numbers of ROSA^{KIT D816V-Glu} cells in affected tissues of NSG mice injected with different amounts of cells after 10 weeks of engraftment

Groups	ROSA ^{KIT D816V-Glu} cell number (x10 ⁶ /mL)		
	PB	Spleen	BM
1x10 ⁶ (n=3)	0.012 ± 0.004	0.856 ± 0.13	4.509 ± 0.690
5x10 ⁶ (n=3)	0.025 ± 0.009*	1.091 ± 0.294	3.618 ± 0.669
10x10 ⁶ (n=3)	0.032 ± 0.007*	1.134 ± 0.195	4.323 ± 0.802

Data are presented as mean ± SD and paired t-test was performed in comparison to the group receiving 1x10⁶ cells.

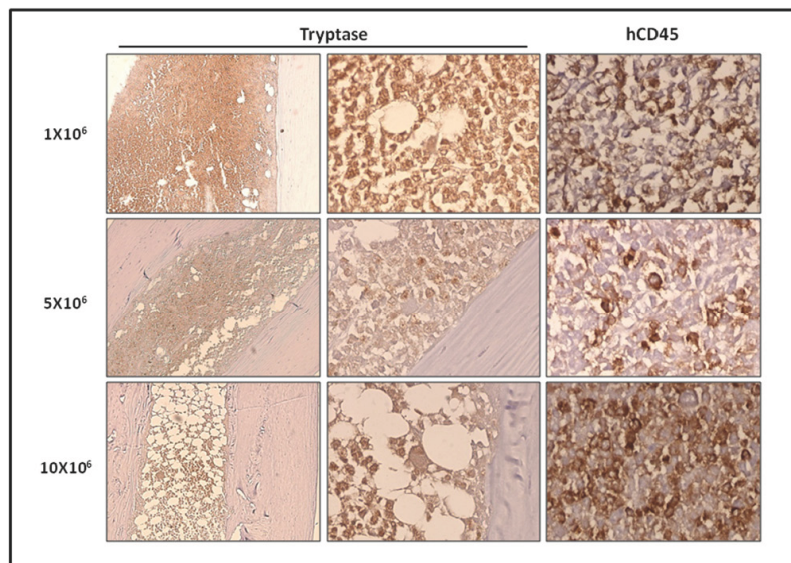


Figure 5: Localization of primary engrafted ROSA^{KIT D816V-Glu} cells in mice BM by IHC detection of tryptase and hCD45. Ten weeks after engraftment, BM sections from the three groups of mice were stained by IHC with an anti-human tryptase antibody (left and middle panels) antibody and an anti-human CD45 antibody (right panel). Staining was visualized by Histomouse Kit, showing human MCs in brownish staining. Magnification is x10 (left panel) and x50 (middle and right panels). Results are from one representative mouse from each group.

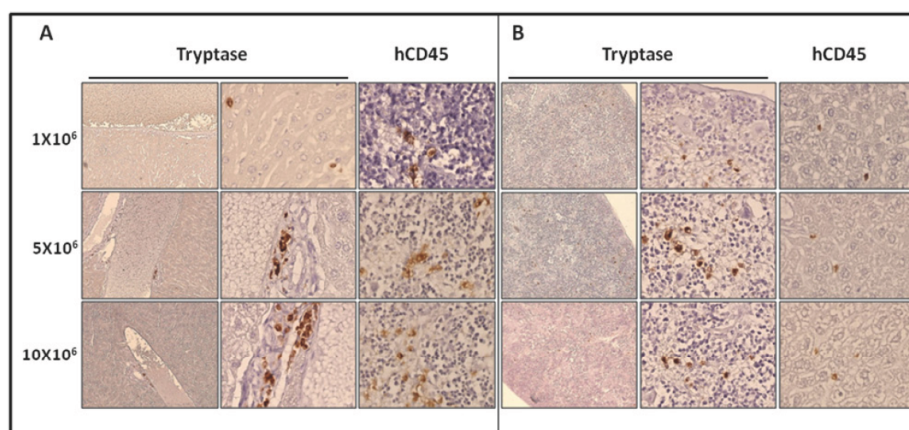


Figure 6: Localization of primary engrafted ROSA^{KIT D816V-Glu} cells in mice spleen and liver by IHC detection of tryptase and hCD45. Ten weeks after engraftment, spleen A. and liver B. sections from the three groups of mice were stained by IHC with an anti-human tryptase (left and middle panels) antibody and an anti-human CD45 (right panel) showing human MCs in brownish staining. Magnification is x10 (left panel) and x50 (middle and right panels). Results are from one representative mouse from each group.

Table 3: Serum tryptase levels in NSG mice injected with different numbers of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells

Groups	Tryptase level (µg/L)
Negative control	< 1.00
1x10 ⁶ (n=3)	7.29 ± 1.00
5x10 ⁶ (n=3)	9.17 ± 0.31*
10x10 ⁶ (n=3)	11.65 ± 2.56

Data are presented as mean ± SD and paired t-test was performed in comparison to the group receiving 1x10⁶ cells.

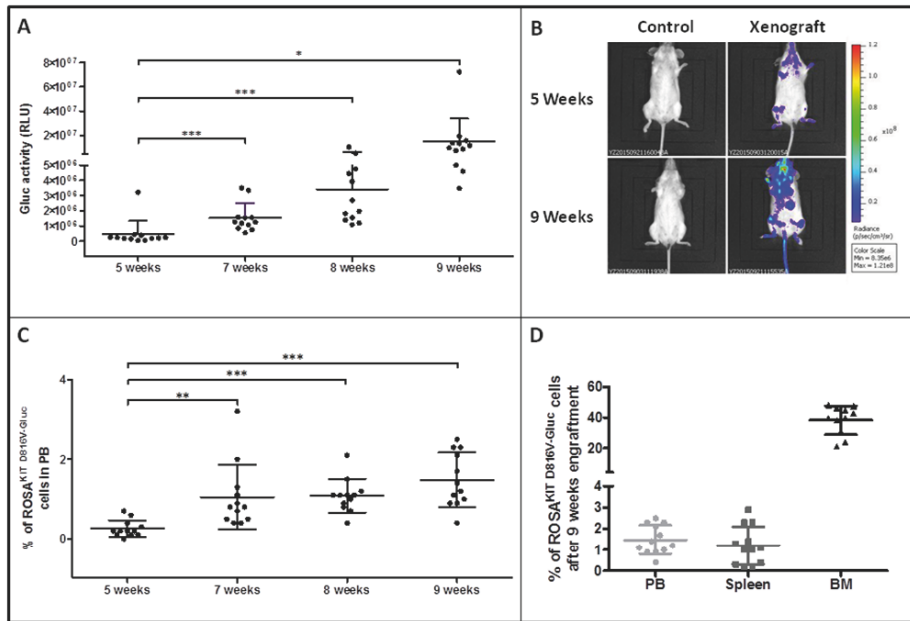


Figure 7: Reconstitution capacity of the human ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in NSG mice after secondary transplantation.

Ten weeks after engraftment in primary recipient mice, human cells were isolated from BM samples and injected into secondary recipient mice (n = 12). Engraftment was assessed 5, 7, 8 and 9 weeks after injection. **A.** Time-dependent increase of Gluc activity in plasma after secondary transplantation with ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells. Each point represents an individual mouse. **B.** *In vivo* imaging of Gluc activity in secondary injected mice (right lane) after 5 weeks (top) and 9 weeks (bottom) versus negative control (left). Results shown are from one representative mouse. **C.** Time-dependent increase in the percentages of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in PB after secondary transplantation. **D.** Percentage of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells after secondary transplantation in PB (●), spleen (■) and BM (▲). The percentage of hCD45⁺/hCD117⁺ was measured using flow cytometry in C and D.

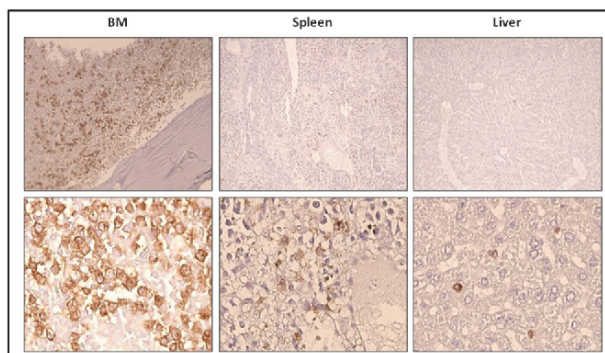


Figure 8: Localization of previously xenotransplanted ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in mice BM using IHC detection of hCD45 after secondary transplantation. BM sections (left panel), spleen sections (middle panel), and liver sections (right panel) stained by IHC with anti-human CD45 antibody showing human cells in brownish staining. Magnification is x10 (top) and x50 (bottom). Each result shown is from one representative mouse having received previously xenotransplanted ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells.

DISCUSSION

SM are rare neoplasms characterized by a specific, recurrent and almost always acquired molecular defect inducing constitutive activation of the KIT receptor [33]. The most frequent defect found in all categories of SM is the *KIT* D816V point mutation [18]. *KIT* D816V mutant is found in > 90% of all ISM cases and in up to 80% of advanced SM patients [34]. Recently, we have established a unique human MC line, termed ROSA^{KIT D816V}, which is considered as the first relevant *in vitro* model of human neoplastic MCs bearing only the *KIT* D816V mutant [26]. We reported that this *KIT* D816V⁺ MC line is highly tumorigenic in immunocompromised mice, by contrast to its parental cell line presenting with a wild type *KIT* (ROSA^{KIT WT}) [26]. However, to the best of our knowledge, there is no *in vivo* model of engraftment of human *KIT* D816V⁺ MCs where of the disease progression can be monitored repeatedly by a simple, non-stressing technique. Thus, we took advantage of the availability of our ROSA^{KIT D816V} cell line to generate a new *in vivo* model of engraftment of human *KIT* D816V⁺ neoplastic MCs in NSG mice, using the Gluc reporter system, that allows to monitor the disease progression by a simple measurement in blood samples, in real time, without stressing the animals [27, 35].

In the first step of our work, we generated ROSA^{KIT D816V} cells expressing the secreted *Gaussia princeps* luciferase [27, 35], termed ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells. We then confirmed by the measurement of Gluc activity in the cell supernatants that ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells effectively express Gluc, as previously reported for other cell models [27]. In addition, we demonstrated that lentiviral infection of ROSA^{KIT D816V} cells with the Gluc-containing construct did not alter their morphology, the *KIT* D816V expression, the constitutive phosphorylation of the KIT receptor, and their SCF-independence. In addition, we demonstrated that

the ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells retained the same sensitivity (or resistance) to different TKIs than the parental ROSA^{KIT D816V} cell line, making it a very attractive tool to screen for new targeted drugs *in vitro* and *in vivo*. Particularly, as previously described in other neoplastic MC models [20], we confirmed the resistance of our *KIT* D816V⁺ MC model towards Imatinib, while the cells remained sensitive to Midostaurin.

With the aim to establish a new *in vivo* model of *KIT* D816V⁺ SM in which the progression of the disease could be easy to follow accurately, we injected various numbers of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in previously irradiated NSG mice. Expression of Gluc by injected cells allowed us to check and monitor accurately not only the cell engraftment but also the progression of SM in NSG mice. Indeed, we observed that, after 4 weeks following the cell transplantation, Gluc activity in the PB of xenografted animals displayed a linear relationship with the number of cells injected, as previously described for other *in vivo* models [27]. However, in our study, there was no apparent difference between the 5x10⁶ and the 10x10⁶ groups at 8 and 10 weeks, suggesting that over a given number of cells injected, saturation is reached (Figure 3A). Since Gluc blood assay complements IVIS, which has the ability to localize the signal in organs [36], we analyzed Gluc expression in the whole body of the injected mice. Quantification through ROI analysis revealed that Gluc intensity was heterogeneous among groups. Comparing the two methods, measurement of Gluc activity in plasma seemed thus more reliable than measurement of Gluc intensity by IVIS to reflect the total MC burden in the animals. In conclusion, Gluc assay in PB provides both a sensitive and quantitative assessment of engraftment, complementing IVIS, which has the ability to localize the signal (thus the grafted cells) in different organs of the animals.

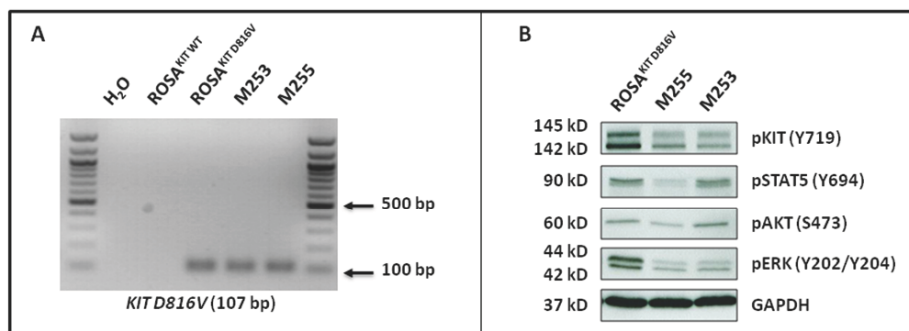


Figure 9: ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells express *in vivo* *KIT* D816V mutant leading to constitutive phosphorylation of KIT and of downstream signaling pathways after secondary transplantation. A. Expression of the *KIT* D816V gene in BM samples of injected mice using allele-specific RT-PCR. *KIT* D816V allele-specific PCR was performed using ROSA^{KIT D816V} cells as a positive control. The image is an inverted form of the original picture. **B.** Spontaneous phosphorylation of the KIT receptor and of its downstream signaling pathways (STAT5, AKT and ERK) revealed by western blotting in ROSA^{KIT D816V} cells and BM cells of secondary transplanted mice. An anti-human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. The lanes were run on the same gel.

Furthermore, we showed that ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells can engraft all injected NSG mice, not only at the BM level but also in spleen, liver and PB, giving rise to a SM-like disease nearing the one found in humans, according to the WHO criteria for the diagnosis of SM [37]. The percentage of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells increased in a time- and number of cells injected-dependent manner, suggesting that the disease progression can be accelerated or slowed by varying the number of cells injected. As expected, the percentage of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in BM was found much higher than in spleen and PB, suggesting that ROSA^{KIT D816V-Gluc} mainly accumulated in BM, as evidenced on BM sections stained for hMC tryptase and hCD45. However, the percentage of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in BM was not strictly parallel to the increase of total ROSA^{KIT D816V-Gluc} cell number in mice, meaning that the cell number reached a plateau in the BM, while the cells continued to proliferate in other tissues. Whatsoever, the percentage of neoplastic human MCs reached 20% or above in the BM of injected animals. This criterion is diagnostic for MCL [8]. In addition, all injected mice presented a high level of serum tryptase (ranging from > 7.0 ng/mL for mice injected with 1x10⁶ cells to > 11.0 ng/mL for mice injected with 10x10⁶ cells), although not exceeding the threshold of 20 ng/mL, a value established for SM diagnosis in humans [8]. This may be explained by the relatively low content of tryptase of the ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells as compared to neoplastic MCs found in the BM of SM patients (data not shown). In addition, one has to keep in mind that, contrasting to the human situation where tryptase is already detectable at several ng/mL in the bloodstream of healthy individuals, the level of human tryptase in healthy mice is equal to zero. Thus, any increase in human tryptase level in PB of our mice reflects MCs engraftment. Interestingly, the level of tryptase in plasma was significantly correlated with the level of Gluc in plasma at 10 weeks (p value = 0.007 - R square = 0.67), indicating that measuring Gluc activity in plasma is a reliable method to monitor disease progression in our *in vivo* model. Of note, while quantification of serum tryptase level required more than 50 µL of plasma, only 5 µL of blood or plasma samples are needed to measure Gluc activity.

All in all, our *in vivo* model of primary xenotransplantation fits well with the one of an advanced (ASM/MCL-like) SM disease, a fact further confirmed by the rapid deterioration of the health status of the mice after 12 weeks of engraftment. In line with this observation, it has to be underlined that the mean overall survival of MCL patients is usually very short in the absence of treatment, being of 6 months or less [38].

In addition, we have demonstrated that the transplantation of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells from primary engrafted NSG mice into secondary recipient increased their capacity of engraftment. This indicates that ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells were adapted to the mouse microenvironment

upon the first transplantation, explaining thus the acceleration of secondary engraftment. Such phenomenon has been previously shown in serial transplantations of other types of leukemic cells isolated from patients [39]. Interestingly, this enhanced engraftment capability of previously xenotransplanted ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells might enable us to use these cells to achieve larger lots of mice for preclinical studies.

Of note, the *in vivo* model presented here is a unique model paralleling human *KIT* D816V⁺ advanced SM disease, with many advantages over previously published *in vivo* models which did not really reproduce the clinical and biological characteristics of advanced SM. In fact, injection of the human leukemic MC line HMC-1.2 exhibiting two *KIT* mutations, *KIT* V560G and *KIT* D816V - which is unusual in SM patients - in SCID mice, gave rise to solid tumors in 6 weeks to 5 months [24]. More recently, we have described a model of mice transgenic for *KIT* D816V, which expressed the human *KIT* D816V mutant specifically in MCs under the control of baboon chymase promoter [22]. However, only one third of the transgenic mice developed an ISM-like disease, with a moderate MC hyperplasia, after 12 to 24 months of latency [22]. In this model, the low disease penetrance and the delay of disease appearance made drug studies problematic, in addition to the fact that the *KIT* D816V mutant was expressed in murine MCs. In 2006, Demehri *et al.* have developed a murine model based on IV injection of P815 cells, a mouse mastocytoma cell line harboring *kit* D814Y mutant (analogue to *KIT* D816Y mutant in human) in DBA/2 mice [25]. This model gave rise to an ASM/MCL-like disease after 6-9 days, with a severe mortality at 9 days, making *in vivo* drug studies impossible to perform in a so short time. More recently, another transgenic mice model have been developed by Gerbault *et al.* using the Cre/loxP recombination system allowing conditional expression of the *Kit* D814V mutant (murine homolog of human *KIT* D816V mutation) under the control of the *Kit* promoter. In this model, the development of a SM-like disease followed a slow kinetics (around 52 weeks), and mice developed colitis associated with mucosal MC accumulation [23]. Thus, this model is far from nearing human *KIT* D816V⁺ advanced SM as it deals with a *Kit* D814V mutant expressed in murine MCs [23].

Furthermore, compared to previous models of SM, our *in vivo* model nears at the best the biological characteristics of neoplastic MCs found *in vivo* in advanced SM patients. Particularly, the presence of *KIT* D816V mutant, together with the constitutive activation of KIT, but also of STAT5, AKT and ERK in these cells mimic the situation observed in such patients where STAT5, AKT and ERK have been found increasingly phosphorylated in parallel with the aggressiveness of the disease and its resistance to TKIs [31, 32]. Our model will thus help to test targeted therapies, alone or in combination, directed not only against the *KIT* D816V

mutant but also against other oncogenic signaling involved in the progression of the disease and in the resistance to TKIs *in vivo*.

In conclusion, the secretion of luciferase (Gluc) by our newly generated human *KIT*^{D816V} Gluc⁺ neoplastic MC line greatly facilitates the assessment of engraftment in mice and allows the accurate monitoring of disease progression. Moreover, although MC engraftment is observed within 4 weeks in 100% of injected mice, health deterioration is observed after 12 weeks or even later, depending on the number of cells injected, allowing thus i) to increase or decrease disease aggressiveness by increasing or decreasing the number of injected cells and ii) sufficient time between the development of the disease and its fatal outcome, which is a critical requisite for easy preclinical drug studies. Such additional studies are ongoing in our laboratory on this model.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The human parental, SCF-dependent non-tumorigenic MC line, ROSA^{KIT}^{WT} was cultured exactly as previously described, in the presence of 10% of supernatant of Chinese hamster ovary (CHO) cells transfected with the murine *SCF* gene, used as a source of SCF [26]. The human neoplastic, SCF-independent tumorigenic MC line ROSA^{KIT}^{D816V} was obtained by stable lentiviral transduction of a construct encoding for the human *KIT* D816V gene and GFP in the parental ROSA^{KIT}^{WT} cell line, as already described [26] and was cultured in the absence of SCF, exactly as previously described [26]. The human MCL cell line HMC-1.2 harboring both *KIT* V560G and *KIT* D816V mutations (kindly provided by Dr. J. H. Butterfield; Mayo Clinic, Rochester, MN) was cultured exactly as already described [40].

Transduction of ROSA^{KIT}^{D816V} cells with *LV-Gluc-CFP* construct

Lentivirus vector construction and production of *LV-Gluc-CFP* were performed as previously described [27, 35]. Briefly, the *Gaussia* luciferase cDNA was cloned into lentivirus vector under the control of the strong constitutive cytomegalovirus (CMV) promoter to produce *LV-Gluc*. In another vector, cDNA for *Gluc* and the optimized *cyan fluorescent protein* (CFP) separated by IRES (*LV-Gluc-CFP*) were cloned under the CMV promoter. Lentivirus particles were produced by transfection of 293T cells as previously described [27]. ROSA^{KIT}^{D816V} cells were then transduced overnight with lentiviral particles of *LV-Gluc-CFP* in order to produce ROSA^{KIT}^{D816V-Gluc} CFP⁺ cells. The efficacy of transduction was measured after 7 days by flow cytometry. ROSA^{KIT}^{D816V-Gluc} cells expressing both GFP and CFP were then sorted using a BD FACSAria (Beckton Dickinson Biosciences).

Morphological and phenotypical analysis of the ROSA^{KIT}^{D816V-Gluc} cell line

In order to ensure that lentiviral transduction of ROSA^{KIT}^{D816V} cells with *LV-Gluc-CFP* construct have not affected the morphology of the cells, May-Grünwald Giemsa (MGG)-stained cytospin preparations of ROSA^{KIT}^{D816V} and ROSA^{KIT}^{D816V-Gluc} cells were examined using a Zeiss Axiophot microscope (Carl Zeiss). In addition, the expression of KIT (CD117) was analyzed on both cell lines cells by direct immunofluorescence using a FACSCalibur (BD Biosciences). Briefly, 2x10⁵ untreated cells were incubated with APC (allophycocyanin)-labeled monoclonal antibody directed against human CD117 (BioLegend). Isotype control was used for each experiment, and at least 10,000 events were recorded on a BD FACSCalibur.

Allele specific RT-PCR for the detection of the *KIT* D816V mutant

Total RNA from 5x10⁶ ROSA^{KIT}^{WT} cells, ROSA^{KIT}^{D816V} cells, ROSA^{KIT}^{D816V-Gluc} cells, HMC1.2 cells, or from 5x10⁵ human cells purified from BM of mice previously xenografted with ROSA^{KIT}^{D816V-Gluc} cells was isolated using TRIzol (Life Technologies) or using Nucleospin RNA (Machery Nagel) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity was determined using a Nanovue plus spectrophotometer (GE Healthcare). Starting from these RNA samples, first strand cDNA synthesis was conducted using the iScript Select cDNA synthesis kit (Biorad) or using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. PCR was performed using primer sequences designed as described by Kristensen *et al.* [41]: a forward primer 5'-AGAGACTTGFCAGCCAGAAAA-3', and a reverse primer 5'-TTAACCACATAATTAGAATCATTC TTGATCA-3' for *KIT* D816V. Reactions were compared to levels of the hypoxanthine phospho-ribo-transferase (HPRT) amplified using the following primers: HPRT F; 5'-ATGGACAGGACTGAACGTCTTGC-3'; and HPRT R; 5'-GACACAAACATGATTCAAATCCCTGA-3'. Complementary DNA were amplified using the following cycle conditions: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min. All PCR experiments included a no template control (water). The amplified PCR products were visualized by staining with ethidium bromide (Electran) after 1.5 % agarose gel electrophoresis in Tris-acetate-EDTA buffer (Euromedex).

Western blot analysis for KIT signaling

Western blots were performed on cell lysates from ROSA^{KIT}^{WT} cells stimulated with SCF, or from unstimulated ROSA^{KIT}^{D816V} and ROSA^{KIT}^{D816V-Gluc} cells, using an antibody against phosphorylated KIT Y719

(Cell Signaling Technology), in order to visualize the phosphorylation state of KIT. Western blots were also performed on lysates of mouse BM cells using antibodies against phosphorylated KIT Y719, phosphorylated STAT5 Y694, phosphorylated AKT S473 and phosphorylated ERK Y202/204 (all from Cell Signaling Technology). Proteins were visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and chemoluminescent substrate (Promega). A mouse monoclonal IgG1 anti-human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) Ab (Santa Cruz Biotechnology) was used as a loading control.

***In vitro* gluc activity assay**

To measure Gluc activity in cell supernatant, ROSA^{KIT D816V} cells expressing or not Gluc were seeded in 24-well plates at various concentrations (from 100 to 1x10⁶ cells/mL) and incubated for 24 hours at 37°C and 5 % CO₂. Twenty microliters of conditioned medium were assayed using 100 µL (5 µg/mL) water-soluble coelenterazine (CTZ) (Nanolight Technologies) in full white plates. Photon counts were acquired immediately using a luminometer (PerkinElmer - EnSpire®).

Analysis of the effects of TKIs on cell proliferation

To ensure that lentiviral transduction of ROSA^{KIT D816V} cells with *LV-Gluc-CFP* construct has not influenced the sensitivity of the cells towards different TKIs, the effect of Imatinib (Sequoia Research) and of Midostaurin (Novartis Pharmaceutical Corporation) on cell proliferation was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) test. ROSA^{KIT D816V} and ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells were incubated with Imatinib or Midostaurin (1 nM to 10 µM) in 96 well plates (Falcon) at 37°C for 72 hours. After incubation, 20 µL of MTT (5 mg/mL) (Life technologies) were added in each well and the plates were incubated for 3 additional hours at 37°C. Then, 100 µL of acidified isopropanol were added to each well to dissolve formazan crystals. The number of living cells was then measured in each condition by reading the absorbance at 570 nm using a plate reader (Thermo-Labsystems). Results were expressed in % of living cells as compared to the control (untreated cells).

Xenogeneic transplantation of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells in NOD-SCID IL-2R^γ^{-/-} (NSG) mice

NSG mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions at the animal facility of Gustave Roussy Institute. Animal experiments were performed in accordance with guidelines established by the Institutional Animal Committee.

Increasing amounts of ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells (1x10⁶, 5x10⁶ or 10x10⁶) were injected to mice (3 groups; 6 mice per group) 24 h after irradiation at 2.5 Gy from a cesium-137 source. Engraftment was assessed after 4, 8 and 10 weeks using quantitative measurement of Gluc activity in plasma, and quantitative measurement of hCD45⁺/hCD117⁺ cells in PB using flow cytometry. After 10 weeks, *in vivo* bioluminescence imaging was performed on engrafted mice. *KIT* wild type (ROSA^{KIT WT} control cells) were not included in this study as a control because they hardly - if not at all - graft in mice, as described elsewhere [26].

Secondary transplantations

Secondary transplantations were performed using human cells isolated from the BM of mice previously injected with ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells. Briefly, after 10 weeks of engraftment, one femur and two tibias were recovered from each animal and flushed in 1 mL of PBS. BM cells were then purified using EasySepTM Mouse/Human Chimera Isolation Kit (Stem Cell) according to the manufacturer's instructions. Purified BM cells were then pooled, and 5x10⁵ cells were IV injected to each NSG mouse (n = 12) 24 h after their irradiation at 2.5 Gy from a cesium-137 source.

Flow cytometry analysis for the detection of xenografted cells

ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells were quantified in mouse PB, BM and spleen samples by flow cytometry using PE-labeled monoclonal antibodies (mAb) directed against human CD117 (Beckman Coulter), PE-Cy7- labeled hCD45 and APC-labeled mCD45 (BD Biosciences). Engrafted ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells were defined as hCD45⁺/CD117⁺ cells.

Measurement of gluc activity *ex vivo* in peripheral blood

Blood samples were collected in EDTA pre-coated vials (KABE Laborstechnik). Gluc activity was determined on 5 µL of plasma by adding 100 µL of water soluble CTZ (50 µg/mL) followed by immediate acquisition of photon counts using a luminometer (PerkinElmer - EnSpire) as previously described by Morse and Tannous [42].

***In vivo* bioluminescence imaging**

Mice were anesthetized using isoflurane and Gluc imaging was performed immediately after IV injection of 100 µL water soluble CTZ (4 mg/kg body weight) using a CCD camera (IVIS 50) and analyzed with Living Image® Software as previously described [42]. Quantitative analysis of Gluc intensity was performed

by measuring luminescence signal intensity using region of interest (ROI) setting of the Living Image® software. ROIs were placed around the total area of body mice. ROI measurements were expressed as total flux (p/s).

Histopathology and immunohistochemistry (IHC) analysis

Deparaffinized sections of BM, spleen and liver processed for heat-induced antigen retrieval were incubated with a mouse anti-human CD45 mAb (Dako) or with a mouse anti-human MC tryptase (Dako). Staining was visualized by Histomouse Kit (Zymed). The sections were then counterstained with hematoxylin and examined using a Zeiss Axiophot microscope (Carl Zeiss).

Serum tryptase measurement

Total serum tryptase was measured using fluorescent enzyme-linked immunoassay that detects specifically human tryptase, following the manufacturer's recommendations (Unicap Pharmacia) [43]. The detection limit of this assay is 1 ng/mL, and in human healthy controls, serum tryptase levels range between less than 1 and 15 ng/mL, with a median of approximately 5 ng/mL [44].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.03 software. Data were analyzed using a two tailed Student's t test. The levels of significance were as follow: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Patrice Dubreuil for providing us with the *KIT* D816V-GFP plasmid construct and the murine SCF-producing CHO-KL cell line. We would like to express our appreciation to all the people belonging to the platform of animal studies at Gustave Roussy Institute for excellent animal colony care. We also thank the imaging and cytometry platform (PFIC) and pathology service at Gustave Roussy Institute.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing financial interest.

GRANT SUPPORT

This study was supported in part by Deciphera Pharmaceuticals, LLC. SB received a Ph D grant from the French Society of Hematology (SFH).

REFERENCES

1. Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP, Metcalfe DD. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol.* 1991; 146:1410-5.
2. Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol.* 2006; 315:13-34.
3. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001; 411:355-65.
4. Galli SJ, Tsai M, Wershil BK, Tam SY, Costa JJ. Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-kit receptor. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995; 107:51-3.
5. Kitamura Y, Oboki K, Ito A. Molecular mechanisms of mast cell development. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2006; 26:387-405; v.
6. Carter MC, Metcalfe DD, Komarow HD. Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014; 34:181-96.
7. Horny HP. Mastocytosis: an unusual clonal disorder of bone marrow-derived hematopoietic progenitor cells. *Am J Clin Pathol.* 2009; 132:438-47.
8. Akin C, Valent P. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis in 2014. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014; 34:207-18.
9. Valent P. Systemic mastocytosis. *Cancer Treat Res.* 2008; 142:399-419.
10. Arock M, Valent P. Pathogenesis, classification and treatment of mastocytosis: state of the art in 2010 and future perspectives. *Expert Rev Hematol.* 2010; 3:497-516.
11. Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB, Marone G, Nunez R, Akin C, Sotlar K, Sperr WR, Wolff K, Brunning RD, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res.* 2001; 25:603-25.
12. Sperr WR, Escribano L, Jordan JH, Schemthaler GH, Kundi M, Horny HP, Valent P. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leuk Res.* 2001; 25:529-36.
13. Morgado JM, Sanchez-Munoz L, Teodosio CG, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, Matito A, Fernandez-Nunez E, Garcia-Montero A, Orfao A, Escribano L. Immunophenotyping in systemic mastocytosis diagnosis: 'CD25 positive' alone is more informative than the 'CD25 and/or CD2' WHO criterion. *Mod Pathol.* 2012; 25:516-21.
14. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, Metcalfe DD. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:10560-4.

15. Arock M, Sotlar K, Akin C, Broesby-Olsen S, Hoermann G, Escribano L, Kristensen TK, Kluin-Nelemans HC, Hermine O, Dubreuil P, Sperr WR, Hartmann K, Gotlib J, et al. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015; 29:1223-32.
16. Schwartz LB. Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006; 26:451-63.
17. Valent P, Sotlar K, Sperr WR, Escribano L, Yavuz S, Reiter A, George TI, Kluin-Nelemans HC, Hermine O, Butterfield JH, Hagglund H, Ustun C, Hornick JL, et al. Refined diagnostic criteria and classification of mast cell leukemia (MCL) and myelomastocytic leukemia (MML): a consensus proposal. *Ann Oncol*. 2014; 25:1691-700.
18. Bibi S, Langenfeld F, Jeanningros S, Brenet F, Soucie E, Hermine O, Damaj G, Dubreuil P, Arock M. Molecular defects in mastocytosis: KIT and beyond KIT. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014; 34:239-62.
19. Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, Akin C, Dimitrijevic S, Butterfield JH, McMahon G, Longley BJ. The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood*. 2002; 99:1741-4.
20. Gleixner KV, Mayerhofer M, Aichberger KJ, Derdak S, Sonneck K, Bohm A, Gruze A, Samorapoompichit P, Manley PW, Fabbro D, Pickl WF, Sillaber C, Valent P. PKC412 inhibits *in vitro* growth of neoplastic human mast cells expressing the D816V-mutated variant of KIT: comparison with AMN107, imatinib, and cladribine (2CdA) and evaluation of cooperative drug effects. *Blood*. 2006; 107:752-9.
21. Gotlib J, Kluin-Nelemans HC, George TI, Akin C, Sotlar K, Hermine O, Awan FT, Hexner E, Mauro MJ, Sternberg DW, Villeneuve M, Huntsman Labeled A, Stanek EJ, et al. Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *N Engl J Med*. 2016; 374:2530-41.
22. Zappulla JP, Dubreuil P, Desbois S, Letard S, Hamouda NB, Daeron M, Delsol G, Arock M, Liblau RS. Mastocytosis in mice expressing human Kit receptor with the activating Asp816Val mutation. *J Exp Med*. 2005; 202:1635-41.
23. Gerbaulet A, Wickenhauser C, Scholten J, Peschke K, Drube S, Horny HP, Kamradt T, Naumann R, Muller W, Krieg T, Waskow C, Hartmann K, Roers A. Mast cell hyperplasia, B-cell malignancy, and intestinal inflammation in mice with conditional expression of a constitutively active kit. *Blood*. 2011; 117:2012-21.
24. Schumacher U, van Damme EJ, Peumans WJ, Butterfield JH, Mitchell BS. Lectin histochemistry of human leukaemic mast cells (HMC-1) transplanted into severe combined immunodeficient (scid) mice. *Acta Histochem*. 1998; 100:1-9.
25. Demehri S, Corbin A, Loriaux M, Druker BJ, Deininger MW. Establishment of a murine model of aggressive systemic mastocytosis/mast cell leukemia. *Exp Hematol*. 2006; 34:284-8.
26. Saleh R, Wedeh G, Herrmann H, Bibi S, Cerny-Reiterer S, Sadvnik I, Blatt K, Hadzijusufovic E, Jeanningros S, Blanc C, Legarff-Tavernier M, Chapiro E, Nguyen-Khac F, et al. A new human mast cell line expressing a functional IgE receptor converts to tumorigenic growth by KIT D816V transfection. *Blood*. 2014; 124:111-20.
27. Wurdinger T, Badr C, Pike L, de Kleine R, Weissleder R, Breakefield XO, Tannous BA. A secreted luciferase for *in vivo* monitoring of *in vivo* processes. *Nat Methods*. 2008; 5:171-3.
28. Valent P, Arock M, Akin C, Sperr WR, Reiter A, Sotlar K, Hartmann K, George TI, Brockow K, Kluin-Nelemans HC, Gotlib J, Metcalfe DD, Horny HP. The classification of systemic mastocytosis should include mast cell leukemia (MCL) and systemic mastocytosis with a clonal hematologic non-mast cell lineage disease (SM-AHNMD). *Blood*. 2010; 116:850-1.
29. Li CY, Baek JY. Mastocytosis and fibrosis: role of cytokines. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002; 127:123-6.
30. Savini P, Rondoni M, Poletti G, Lanzi A, Quercia O, Soverini S, De Benedittis C, Musardo G, Martinelli G, Stefanini GF. Serum total tryptase level confirms itself as a more reliable marker of mast cells burden in mast cell leukaemia (aleukaemic variant). *Case Rep Hematol*. 2015; 2015:737302.
31. Bibi S, Arslanhan MD, Langenfeld F, Jeanningros S, Cerny-Reiterer S, Hadzijusufovic E, Tchertanov L, Moriggl R, Valent P, Arock M. Co-operating STAT5 and AKT signaling pathways in chronic myeloid leukemia and mastocytosis: possible new targets of therapy. *Haematologica*. 2014; 99:417-29.
32. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther*. 2002; 1:1115-24.
33. Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol*. 2007; 138:12-30.
34. Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Munoz L, Alvarez-Twose I, Mayado A, Caldas C, Matito A, Morgado JM, Munoz-Gonzalez JJ, Escribano L, Garcia-Montero AC, Orfao A. Detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol*. 2015; 28:1138-49.
35. van Rijn S, Nilsson J, Noske DP, Vandertop WP, Tannous BA, Wurdinger T. Functional multiplex reporter assay using tagged Gaussia luciferase. *Sci Rep*. 2013; 3:1046.
36. Badr CE, Tannous BA. Bioluminescence imaging: progress and applications. *Trends Biotechnol*. 2011; 29:624-33.

37. Brockow K, Metcalfe DD. Mastocytosis. *Chem Immunol Allergy*. 2010; 95:110-24.
38. Brockow K. Epidemiology, prognosis, and risk factors in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014; 34:283-95.
39. Meyer LH, Eckhoff SM, Queudeville M, Kraus JM, Giordan M, Stursberg J, Zangrando A, Vendramini E, Moricke A, Zimmermann M *et al*: Early relapse in ALL is identified by time to leukemia in NOD/SCID mice and is characterized by a gene signature involving survival pathways. *Cancer Cell*. 2011, 19:206-217
40. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res*. 1988; 12:345-55.
41. Kristensen T, Vestergaard H, Moller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn*. 2011; 13:180-8.
42. Morse D, Tannous BA. A water-soluble coelenterazine for sensitive *in vivo* imaging of coelenterate luciferases. *Mol Ther*. 2012; 20:692-3.
43. Schwartz LB, Bradford TR, Rouse C, Irani AM, Rasp G, Van der Zwan JK, Van der Linden PW. Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systemic anaphylaxis. *J Clin Immunol*. 1994; 14:190-204.
44. Sperr WR, Jordan JH, Baghestanian M, Kiener HP, Samorapoompichit P, Semper H, Hauswirth A, Schernthaner GH, Chott A, Natter S, Kraft D, Valenta R, Schwartz LB, et al. Expression of mast cell tryptase by myeloblasts in a group of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001; 98:2200-9.

Poster sur le projet ROS présenté au congrès de la SFH 2017

Poster sur le projet ASCL2 présenté au congrès de la SFH 2017

L'axe CXCR4/CXCL12 axis régule les réponses au stress oxydatif des cellules souches hématopoïétiques : implication de la PKC beta et de la protéine redox p66^{Shc}

Monika Wittner¹, Yanyan Zhang¹, Mallorie Dépond¹, Liang He¹, Viviane Baral¹, Adlen Foudi², Edward Kwarteng¹, Isabelle Plo¹, Paule Opolon³, Olivier Herault⁴, Evelyne Lauret⁵, Eric Solary¹, William Vainchenker¹, Virginie Joulin¹, Fawzia Louache¹

(1) INSERM U1170, Institut Gustave Roussy, Villejuif, (2) INSERM UMRS 935, Villejuif, (3) Laboratoire de pathologie expérimentale, IRCIV, Institut Gustave Roussy, Villejuif, (4) CNRS UMR 7292 –GICC, Tours, (5) INSERM U1116 – CNRS UMR S1016, Institut Cochin, Paris.

Introduction

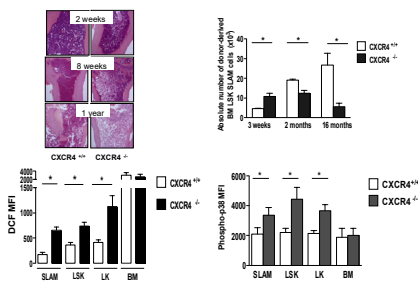
Les espèces réactives d'oxygène (ROS) sont produites durant la respiration oxydative et en réponse à des stress exogènes et endogènes, tels que les irradiations ionisantes, les traitements génotoxiques et l'inflammation. Dans l'hématopoïèse, de faibles quantités de ROS jouent un rôle physiologique dans différents processus, dont la différenciation et la migration. Cependant, à fortes doses, les ROS sont responsables de l'oxydation des constituants cellulaires, activent les voies d'apoptose et conduisent à la sénescence et l'épuisement prématuré des cellules souches hématopoïétiques (CSHs).

Les CSHs sont localisées dans un microenvironnement appelé niche médullaire et sont caractérisées par une faible production de ROS. Les mécanismes qui régulent le niveau de ROS dans les CSHs ne sont pas élucidés, et le rôle du microenvironnement dans cette régulation n'a pas été étudié. Parmi les facteurs de la niche, la chimiokine CXCL12 et son récepteur CXCR4 sont indispensables pour la domiciliation et la rétention des CSHs dans la moelle osseuse, ainsi que pour leur maintien en quiescence.

Dans ce travail, nous avons émis l'hypothèse que le microenvironnement au travers de la chimiokine CXCL12 et de son récepteur CXCR4 est impliqué dans la régulation des réponses au stress oxydatif des CSHs.

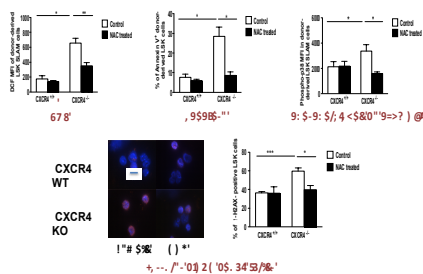
Résultats:

1-Les souris chimériques *Cxcr4*^{-/-} présentent une altération progressive de l'hématopoïèse, une augmentation des ROS endogènes et une activation de la voie p38MAPK



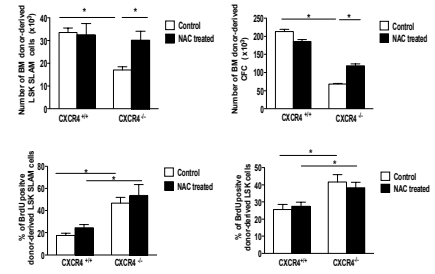
Des souris chimériques ont été générées par transplantation de cellules de foie foetal CXCR4^{+/+} ou CXCR4^{-/-} à des souris irradiées. A différents temps, les CSHs sont quantifiées par cytométrie. Les ROS sont quantifiés avec la sonde DCF-DA et la phosphorylation de p38MAPK est déterminée par immunocytochimie.

2-Les défauts de fonction des CSHs *Cxcr4*^{-/-} sont reversés in vivo par un traitement par l'antioxydant N-acetyl-L-cystéine (NAC)



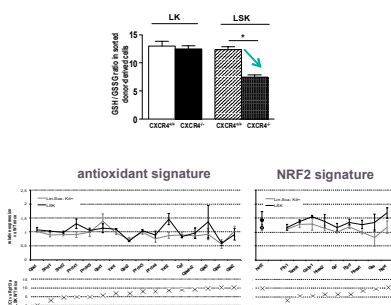
Cinq semaines après reconstitution par des cellules de foie foetal CXCR4^{+/+} ou CXCR4^{-/-}, les souris chimériques ont été traitées in vivo par le NAC pendant 4 semaines. Puis, les ROS sont quantifiés avec la sonde DCF-DA, l'apoptose est évaluée par cytométrie (Annexin-V/DAPI) et la phosphorylation de p38MAPK déterminée par immunocytochimie. Les cassures d'ADN double-brins sont déterminées par immunomarquage γ -H2AX.

3-Le traitement in vivo par l'antioxydant NAC empêche la déplétion des CSHs *Cxcr4*^{-/-} sans restaurer leur quiescence



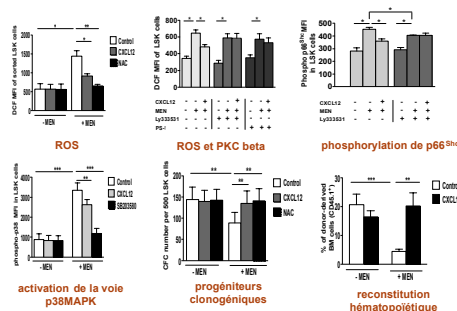
Cinq semaines après reconstitution par des cellules de foie foetal CXCR4^{+/+} ou CXCR4^{-/-}, les souris chimériques ont été traitées in vivo par le NAC pendant 4 semaines. Les CSHs médullaires sont quantifiées par cytométrie et les progéniteurs par des tests clonogéniques. Leur état prolifératif est déterminé par incorporation de BrdU.

4-Les progéniteurs *Cxcr4*^{-/-} ont un réservoir intracellulaire en glutathione diminué et une surexpression de plusieurs enzymes antioxydantes



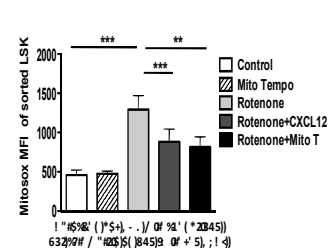
(A) Le rapport de la forme réduite de glutathione (GSH) sur sa forme oxydée (GSSG) est évalué par le GSH/GSSG-Glo assay kit. (B) L'expression des enzymes antioxydantes a été déterminée par qRT-PCR. Les résultats sont présentés comme rapport d'expression relative des cellules *Cxcr4*^{-/-} sur cellules *Cxcr4*^{+/+}. Les valeurs delta Ct (vs Rpl13a) indiquent le niveau d'expression de chaque transcrit.

5-L'axe CXCR4/CXCL12 réduit les effets délétères du stress oxydatif induit par la menadione (MEN) dans les progéniteurs et les CSHs in vitro : implication de p66^{Shc} et de la PKC beta



Des progéniteurs de souris WT de phénotype LSK obtenus par tri cellulaire ont été cultivés pendant 1h en absence ou en présence de menadione. Les effets de CXCL12 ou de NAC sont évalués sur le niveau des ROS, la phosphorylation de p66^{Shc}, l'activation de la voie p38MAPK, la prolifération des progéniteurs clonogéniques et la reconstitution hématopoïétique.

6-Le stress oxydatif mitochondrial est diminué par CXCL12 dans les progéniteurs murins



Des progéniteurs de souris WT obtenus par tri cellulaire ont été cultivés en absence ou en présence de rotenone. Les effets de CXCL12 sont évalués sur le niveau des ROS mitochondriaux.

Conclusion

- Les CSHs *Cxcr4*^{-/-} présentent des défauts de maintien à long terme de l'hématopoïèse et une sortie de quiescence associée à une augmentation du stress oxydatif, une activation de la voie p38MAPK, une augmentation de l'apoptose et des cassures d'ADN double-brins.
- Le traitement in vivo par l'antioxydant NAC réduit la déplétion des CSHs *Cxcr4*^{-/-} sans restaurer leur quiescence.
- In vitro, CXCL12 réduit les effets délétères liés à l'induction d'un stress oxydatif mitochondrial et réduit la phosphorylation de la protéine redox p66^{Shc} impliquée dans la génération des ROS mitochondriaux.
- Ces données montent le rôle primordial de la niche médullaire et de l'axe CXCR4/CXCL12 dans la protection des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) du stress oxydatif, favorisant de ce fait une augmentation de leur durée de vie.

IMPLICATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION ASCL2 DANS L'HÉMATOPOÏÈSE NORMALE ET LEUCÉMIQUE

Mallorie Dépond¹, Yanyan Zhang², Liang He², Monika Wittner¹, Viviane Baral¹, Ruoping Tang², Olivier Legrand², Marie-Christine Béné³, François Delhommeau², Virginie Joulin¹, Olivier Albagli⁴, Fawzia Louache²

1 INSERM U1170, Gustave Roussy, Villejuif; 2 Service d'hématologie et thérapie cellulaire, Hôpital St Antoine, Paris; 3 Laboratoire d'hématologie biologique, Hôtel Dieu, Nantes; 4 Endocrinologie, métabolisme and diabète, Institut Cochin, Paris



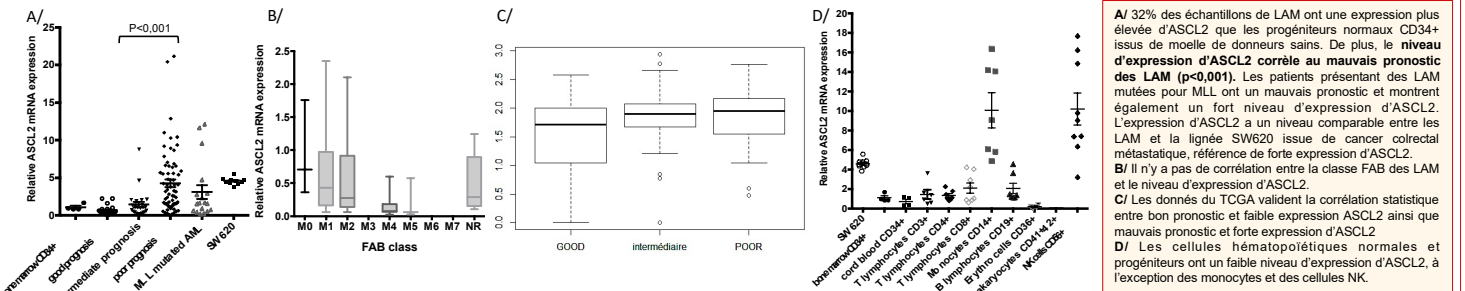
CONTEXTE & OBJECTIFS

Le facteur de transcription **ASCL2** (Achaete Scute-like 2) à domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH) capable se lie à l'ADN sur les E-box binding sites (5'-CAGGTG-3') et participe à la régulation de l'expression du récepteur de chimiotaxine **CXCR4**. Inversement, il est **régulé par CXCR4 et la voie Wnt** suggérant une interaction entre CXCR4 et ASCL2 (*Xu-gang Hu, J Clin Pathol 2015*). Des travaux montrent son implication dans le maintien de l'identité des cellules souches intestinales où sa surexpression induit une hyperplasie intestinale alors que son inhibition induit une perte des cellules souches intestinales (*Jubb AM, Oncogene 2006*). Enfin, son expression est élevée dans de nombreux cancers. Un seul travail portant sur les lymphocytes T folliculaires a montré qu'il régule l'expression des récepteurs de chimiotaxine dont CXCR4 (*Liu X, Nature 2014*) mais il n'existe aucune donnée sur son expression et sa fonction dans les hémopathies malignes. Ce travail vise à analyser l'expression et la fonction d'ASCL2 dans l'hématopoïèse normale et comprendre son implication dans le développement des leucémies aiguës myéloïdes (LAM).

RÉSULTATS

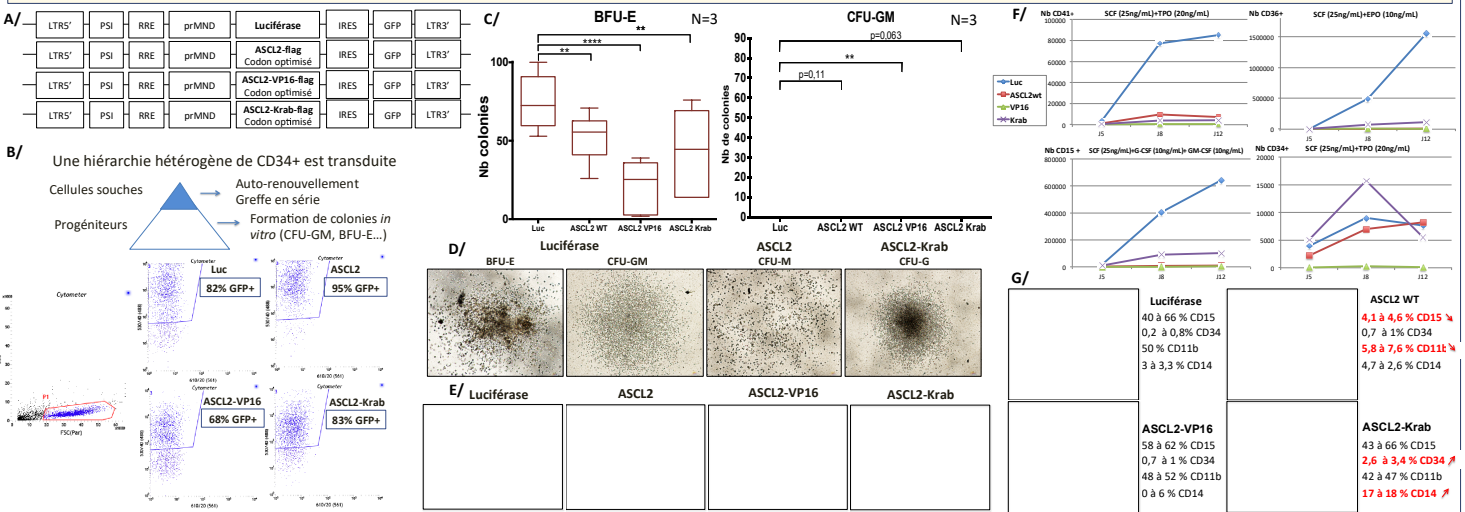
1- ASCL2 est surexprimé dans les LAM et son expression corrèle au mauvais pronostic

135 échantillons de patients LAM contenant au minimum 70% de blastes ont été analysés par qRT-PCR pour l'expression d'ASCL2. Les cellules matures issues de sang périphérique ou progéniteurs de sang de cordon ont été triées par cytométrie en flux.

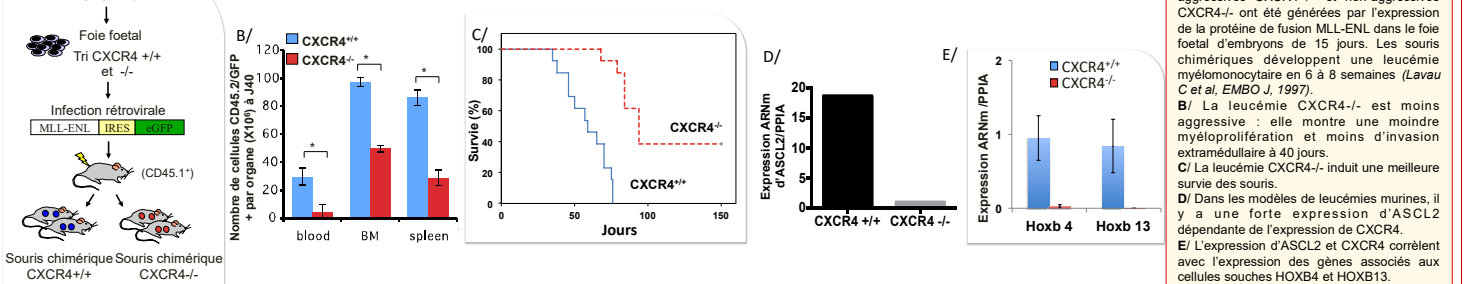


2- La surexpression d'ASCL2 inhibe la prolifération et induit un biais de différenciation

A/ Constructions lentivirales codant pour ASCL2 et de formes modifiées par l'ajout de modules VP16 de transactivation ou KRAB (de KOX1) de répression pour forcer l'activité du facteur de transcription. Luciférase correspond au contrôle. **B/** Stratégie d'infection pour surexprimer ASCL2 dans des progéniteurs CD34+ issues de sang de cordon ombilical et tri des cellules GFP+ par cytométrie en flux. Des progéniteurs précoces et matures sont transduits. **C/** En méthylcellulose, la surexpression d'ASCL2 inhibe la capacité des progéniteurs à former des colonies érythroïdes (BFU-E) en comparaison aux cellules transduites par Luciférase-GFP (Luc) avec un effet dramatique d'ASCL2-VP16. Cet effet est également observé sur les colonies myéloïdes (CFU-GM) pour ASCL2 et ASCL2-VP16 mais dans la condition ASCL2-Krab, il y a davantage de colonies granulueuses hyperprolifératives tel que illustré en **D/** (pas de colonies observables pour ASCL2 VP16, seulement des cellules isolées). **E/** Les colonies ont été resuspendues en PBS puis colorées en MGG sur lames. **F/** 72h après transduction, les CD34+ ont été cultivées en milieu de différenciation. Dans toutes les conditions, ASCL2 inhibe la prolifération des cellules mais ASCL2 Krab permet l'expansion précoce des cellules CD34+ **G/** A 12 jours de différenciation en SCF/G-CSF/GM-CSF, les cellules ont été colorées en MGG sur lames et analysées en cytométrie de flux. ASCL2 et ASCL2-Krab induisent des biais de différenciation dans la lignée myéloïde.

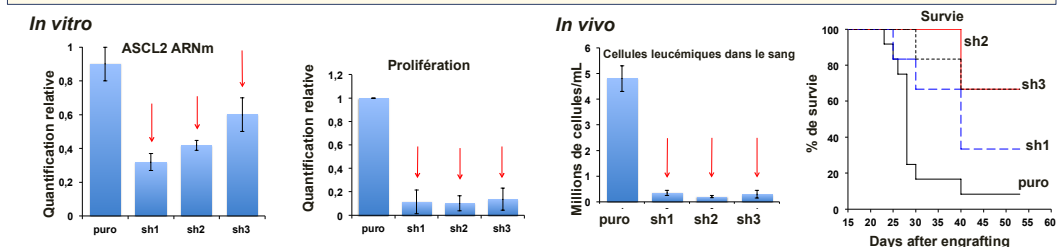


3- Etude d'ASCL2 et CXCR4 dans des modèles de leucémies murines agressives et non-aggressives



4- L'inhibition d'ASCL2 dans les cellules leucémiques murines induit une diminution majeure du nombre de cellules leucémiques et retarde la progression leucémique *in vivo*, améliorant la survie des souris

Les blastes leucémiques murins CXCR4+/+, exprimant un haut niveau d'ARNm d'ASCL2, ont été transduits avec des shRNA ciblant ASCL2 puis ont été sélectionnés par la puromycine (3µg/mL, 24h) et greffés à des souris afin d'observer les effets de la perte de fonction d'ASCL2 sur le développement leucémique.



CONCLUSIONS

- ◆ Dans ce travail, nous reportons pour la première fois l'expression élevée d'ASCL2 dans les LAM.
- ◆ Nous avons mis en évidence une corrélation entre l'expression d'ASCL2 et le mauvais pronostic des LAM.
- ◆ Le modèle *in vitro* de surexpression dans les cellules humaines induit une diminution du nombre de progéniteurs en méthylcellulose, un biais de différenciation ainsi qu'une inhibition de la prolifération.
- ◆ Dans les modèles de leucémies murines, ASCL2 est associé à l'agressivité leucémique et son inhibition induit un délai dans la progression leucémique et une meilleure survie des souris.
- ◆ Tous ces résultats indiquent un rôle majeur d'ASCL2 dans le développement leucémique.