



**HAL**  
open science

# Étude de la quiescence cellulaire et des mécanismes de reprogrammation des cellules souches pré-leucémiques induites par l'oncogène PAX5-ELN

Vincent Fregona

► **To cite this version:**

Vincent Fregona. Étude de la quiescence cellulaire et des mécanismes de reprogrammation des cellules souches pré-leucémiques induites par l'oncogène PAX5-ELN. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30038 . tel-04257766

**HAL Id: tel-04257766**

**<https://theses.hal.science/tel-04257766v1>**

Submitted on 25 Oct 2023

**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

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par

**Vincent Fregona**

Le 21 Avril 2023

### Étude de la quiescence cellulaire et des mécanismes de reprogrammation des cellules souches pré-leucémiques induites par l'oncogène *PAX5-ELN*

École doctorale et discipline ou spécialité

BSB Biologie Santé et Biotechnologie, Cancérologie

Unité de recherche

Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Equipe IGAALD

Directrice(s) ou Directeur(s) de Thèse

Dr Bastien Gerby

**Jury**

Dr Michel Cogné	<i>Directeur de recherche</i>	Rapporteur
Dr Emmanuelle Clappier	<i>PU-PH</i>	Rapporteur
Dr Diana Passaro	<i>Chargée de recherche</i>	Rapporteur
Dr Bertrand Nadel	<i>Directeur de recherche</i>	Examineur
Pr Véronique De Mas	<i>PU-PH</i>	Examineur
Dr Bastien Gerby	<i>Chargé de recherche</i>	Directeur

## Resumé

Les leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B) représentent les cancers pédiatriques les plus fréquents et sont caractérisées par l'accumulation dans la moelle osseuse de progéniteurs B immatures d'origine clonale. Leur développement multi-étapes est caractérisé par l'accumulation successive d'altérations oncogéniques. Les LAL-B sont classées selon différents sous-groupes oncogéniques caractérisés par l'identité de l'oncogène primaire porté par les cellules leucémiques telles que les translocations ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1, BCR-ABL1, ou bien certaines altérations de PAX5 (sous-groupe « Pax5-alt » incluant transcrit de fusions et mutations gain de fonction). Des analyses pangénomiques ont été utilisées afin de décrire le paysage génomique et le profil d'expression des patients atteints de LAL-B. Ces études ont permis de stratifier les patients et de découvrir de nouvelles opportunités thérapeutiques. Bien que les traitements par chimiothérapies des LAL-B pédiatriques soient efficaces pour induire une rémission à long terme, ils ne préviennent pas la rechute de la maladie chez 15 à 20% des patients. Aussi, la non-spécificité et la lourdeur de ces traitements provoquent un certain nombre d'effets indésirables et n'excluent pas la rechute de la maladie.

Dans l'hématopoïèse normale, la fonction d'auto-renouvellement est une caractéristique distincte des cellules souches hématopoïétiques (CSHs). Les progéniteurs plus avancés dans la différenciation, incluant les progéniteurs lymphoïdes, en sont dépourvus. Dans les leucémies aiguës, plusieurs évidences suggèrent que l'acquisition d'un premier évènement oncogénique peut reprogrammer un progéniteur engagé en cellule souche pré-leucémique (pré-CSL). Ce processus établit ainsi un état pré-leucémique, où les propriétés souches reprogrammées par l'oncogène primaire permettent à terme la transformation leucémique par l'acquisition d'altérations génétiques additionnelles. Au stade leucémique, les pré-CSLs hautement diluées dans la masse tumorale peuvent servir de réservoir à la rechute de la maladie. En effet, ces cellules sont résistantes aux traitements conventionnels de chimiothérapie. L'identification et la caractérisation des pré-CSLs représentent donc un défi de premier ordre pour le développement de nouvelles thérapies ciblées. L'utilisation de modèles de souris transgéniques dans lesquels sont activés des oncogènes primaires, aide donc à la compréhension des différentes étapes du développement leucémique et permet un accès privilégié à la phase pré-leucémique.

C'est pourquoi j'ai utilisé pendant ma thèse un modèle transgénique de souris qui récapitule le développement multi-étapes de la leucémogénèse par l'expression de la translocation *PAX5-ELN*. Mon travail indique qu'il existe un lien causal entre le blocage de la

différenciation, l'auto-renouvellement et l'émergence des pré-CSLs. Par l'utilisation d'un immunophénotypage multiparamétriques, j'ai montré que PAX5-ELN perturbe la différenciation des cellules pré-leucémiques en renforçant la voie de signalisation IL7r/JAK-STAT. Cette perturbation est associée à l'induction de pré-CSLs rares et quiescentes qui soutiennent l'activité initiatrice de la leucémie. L'intégration des données transcriptomiques et d'accessibilité à la chromatine des pré-CSLs quiescentes m'a permis de démontrer qu'elles perdaient partiellement leur identité de cellules B et réactivaient un programme moléculaire plus immature. La construction de leur réseau de régulation transcriptionnelle (TNR) m'a permis d'incriminer le facteur de transcription Egr1 dans le contrôle de la quiescence/résistance des pré-CSLs PAX5-ELN, ainsi qu'au sein de cellules blastiques humaines. Dans l'ensemble, mon travail souligne l'importance de l'étude des caractéristiques fonctionnelles telles que la quiescence et la plasticité cellulaire dans les mécanismes de résistance et d'initiation leucémique.

## Abstract

B-acute lymphoblastic leukemias (B-ALL) represent the most frequent pediatric cancer and are characterized by the accumulation of immature B progenitors in the bone marrow. Their multi-step development is characterized by the successive accumulation of oncogenic alterations. The first oncogenic event initiates the cell towards a leukemic fate that will be specific to it. Among them are different chromosomal translocations such as *ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL1* or *TCF3-PBX1*(...) and the more recently defined subgroup that includes all *PAX5* translocations and its gain-of-function mutations (Pax5-Alt). Genome-wide analyses were used to map the genomic landscape and expression profile of patients with ALL. These studies allowed for patient stratification and the discovery of new therapeutic opportunities. Although chemotherapies for pediatric B-ALL are effective in inducing long-term remission, they do not prevent disease relapse in 15 to 20% of patients. In addition, the non-specificity and intensity of these treatments cause a number of adverse effects as well as not excluding the disease relapse.

In normal hematopoiesis, self-renewal function is a distinct feature of hematopoietic stem cells (HSCs). Progenitors committed in the differentiation, including lymphoid progenitors, lack it. In acute leukemia, several evidences suggest that the acquisition of a first oncogenic event can reprogram a committed progenitor into a pre-leukemic stem cell (pre-LSC). The pre-LSCs establish a pre-leukemic state, in which stem cell-like properties induced by the primary oncogene eventually led to leukemic transformation through the acquisition of additional genetic alterations. At the leukemic stage, pre-CSLs are highly diluted in the tumor mass and can serve as a reservoir for disease relapse. Indeed, these cells are resistant to conventional chemotherapies. Thus, the identification and characterization of pre-CSLs is a major challenge for the development of new targeted therapies. The use of transgenic mouse models in which primary oncogenes are activated, helps to understand the different stages of leukemic development and allows for the access to the pre-leukemic phase.

Therefore, during my thesis, I used a transgenic mouse model that recapitulates the multi-step development of leukemogenesis through the expression of the *PAX5-ELN* translocation. My work indicates that there is a causal link between the blockage of differentiation, the self-renewal and the emergence of pre-LSCs. Using multiparametric immunophenotyping, I showed that *PAX5-ELN* disrupts at the pre-leukemic stage the B-cell differentiation by enhancing the *IL7r/JAK-STAT* signaling pathway. This disruption is associated with the induction of rare and quiescent pre-CSLs that support leukemia initiating activity. Integration of transcriptomic and

chromatin accessibility data of quiescent pre-CSLs allowed me to demonstrate that they lost their B-cell identity and reactivate a more immature molecular program. The construction of their transcriptional regulatory network (TNR) incriminates the transcription factor Egr1 in the control of the quiescence/resistance of PAX5-ELN pre-LSCs, but also in human blasts. Overall, my work highlights the importance of studying functional features such as quiescence and cellular plasticity in the mechanisms of leukemic resistance and initiation.

## Remerciements

Que d'années à se remémorer et de chemin parcouru depuis mon arrivé au sein de cette équipe de recherche ! Je souhaitais donc prendre le temps de remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné pendant mon passage à Toulouse.

Tout d'abord je tiens à remercier Bastien Gerby, mon directeur de thèse, qui a suffisamment cru en moi dès notre rencontre pour me donner l'opportunité de rejoindre le vaste monde de la cancérologie et de l'hématologie. Je n'avais pourtant aucun bagage dans ces domaines à l'époque ! J'ai apprécié pouvoir échanger de sciences à tes côtés, notre franc parlé et notre curiosité scientifique respectives ayant donné lieu à des débats d'idées que j'ai adoré entretenir, années après années ! Ne lâche rien pour les projets futurs et je sais que tu parviendras à continuer de produire de la science de qualité.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon jury et notamment Véronique De Mas qui me fait l'honneur de présider ce jury malgré notre demande tardive (et un report de week-end !). Je remercie aussi le professeure Emmanuelle Clappier pour l'évaluation de mon travail largement fondamental d'un point de vue plus clinique. Je remercie également Bertrand Nadel, Diana Passaro et Michel Cogné pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse et éprouve une gratitude toute particulière d'être évalué par des experts aussi renommés dans leurs domaines. Je suis certains que cela permettra des échanges intéressants autour des notions et des concepts que j'ai développé pendant mon travail de thèse.

Je remercie notre directeur d'équipe, Eric Delabesse, pour sa confiance et son aval dans mes projets et mes idées, malgré ma fougue et mon envie permanente de chambouler/renouveler nos méthodes. J'en profite pour remercier Stéphanie Laval et Nais Prade, du côté du laboratoire de biologie moléculaire, pour leur implication sans faille, leur bonne humeur et leur talent inné à rendre possible l'impossible !

Je remercie également le professeure Marlène Pasquet qui m'a permis d'avoir un aperçu plus que concret de la clinique et de la prise en charge des patients, tout en ayant un regard critique sur l'intérêt clinique de mes découvertes ! De plus, je garderais en tête longtemps ces apéros en ta compagnie et nos discussions malgré le fait que l'on ne soit jamais d'accord !

Je tenais aussi à écrire quelques mots concernant Sandrine Sarrazin et Stéphane Mancini, qui m'ont accompagné durant cette thèse en tant que comité de suivi et qui se sont toujours rendu accessible et plein de bon conseil.

Mes remerciements s'adressent ensuite à l'ensemble des autres membres de l'équipes de recherches, et tout particulièrement à mes deux compagnons de crimes qu'ont été Laura Jamrog et Laetitia Largeaud. J'ai appris grâce à elles à mettre un visage sur les mots abnégations et passions, et j'espère vraiment que nos chemins finiront par se recroiser. Je n'oublie évidemment pas Manon et Mathieu pour leur disponibilité et leur patience pour l'écoute de mes délires scientifiques presque quotidien ! Je remercie également tous les autres membres du labo : Sylvie, Camille, Esmaa, Cyril et Christine ... ainsi que la relève comme j'aime appeler Antoine et Pauline. De plus, j'émets une petite pensée envers tous ceux qui m'ont marqué lors de mon passage au CRCT : Jojo, Maximus, Rita, Marianne, Mathilde et tous les autres que j'oublie probablement.

Je remercie mes parents, mon bro et ma sœur qui malgré la distance et le manque cruel (et maladif !) de nouvelles que je leur faisais parvenir, ont su se rendre présent pour moi quand il le fallait. Je suis également reconnaissant envers toute la belle-famille Valérie, Alice (Imoutochan !) et Clément qui m'ont apporté du soutien toutes ces années.

Je remercie aussi toute la team des Nancéiens, que j'ai pu continuer de côtoyer malgré la distance ainsi que les Toulousains et les « Camarades » m'ayant forcé à sortir quand je n'avais la tête qu'à bosser (TMTC) ! J'ai de plus une pensée pleine d'affection pour Emi et Charly : les résidents del famoso 76 Nicolas Louis Vauquelin ou on en aura vécu des aventures !

Je veux enfin bien évidemment remercier les derniers survivants des gamins, Fabinou que je n'oublierais pas cette fois-ci. Kevin avec qui j'ai eu l'occasion de parcourir le globe ces dernières années et qui m'a fait comprendre, ou tout du moins a t'il essayé, l'importance de ne pas se focaliser uniquement sur le travail (gare à l'ours bleu). Florian, dont la présence parsema mon séjour Toulousain à cette bonne vieille adresse de Trouhaut, m'accueillant telle une auberge espagnole au moindre de mes caprices ! J'espère cependant qu'ils sauront se faire pardonner de leur absence à ma soutenance... tout fout le camp moi je vous dis !



## Table des matières

Resumé .....	2
Abstract .....	4
Remerciements .....	6
ABREVIATION.....	13
INTRODUCTION.....	18
I/ Cellules souches hématopoïétiques .....	19
I.1 Généralités sur l'hématopoïèse .....	19
I.1.A – Lignages hématopoïétiques.....	19
I.1.B – Concept de la cellule souche hématopoïétique : .....	20
I.1.C – Développement hématopoïétique embryonnaire.....	20
1.1.D - Micro-environnement de la moelle osseuse.....	22
I.2 / Propriétés fonctionnelles de la cellule souche hématopoïétique .....	24
I.2.A – De la quiescence à la dormance cellulaire : comment retarder l'épuisement des CSHs.....	26
I.2.A.a Définition .....	26
I.2.A.b Mécanismes moléculaires impliqués dans le recrutement des CSHs .....	27
1) Facteurs extrinsèques .....	27
2) Facteurs intrinsèques.....	28
I.2.A.c Mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de la dormance des CSHs .....	29
1) Facteurs extrinsèques .....	29
2) Facteurs intrinsèques.....	30
I.2.A.d Approches expérimentales permettant l'étude de la quiescence.....	31
1) Caractérisation par mesure unique .....	32
2) Caractérisation par rétention de signal .....	32
3) Méthodes alternatives .....	35
I.2.B – L'auto-renouvellement : ou comment préserver l'immaturation cellulaire.....	38

I.2.B.a Définition.....	38
I.2.B.b Séquestration asymétrique des composants d’immaturité chez les CSHs .....	39
I.2.B.c Dépendance du micro-environnement pour la polarisation cellulaire.....	42
I.2.B.d Quantification d’un potentiel d’auto-renouvellement : expérience de transplantation .....	44
I.2.B.e Expansion et préservation fonctionnelle des CSHs ex vivo.....	45
I.2.C – Potentiel de différenciation : .....	47
I.2.C.a Hétérogénéité de la plasticité cellulaire chez les CSHs.....	48
I.2.C.b Biais de lignage .....	49
I.2.C.c Plasticité cellulaire et reprogrammation :.....	52
1) Plasticité des CSHs pour d’autres lignages tissulaires .....	52
2) Reprogrammation induite par les facteurs de Yamanaka.....	52
3) Modèle de pluripotence par balancement.....	55
4) Transdifférenciation directe.....	56
5) Plasticité induite par l’absence de PAX5 dans les progéniteurs B.....	57
II / La lymphopoïèse B.....	58
II.1 - Caractérisation phénotypique.....	58
II.1.A - Chez la souris .....	58
II.1.B - Chez l’Homme.....	59
II.2 – Lymphopoïèse B de la moelle osseuse .....	61
II.2.A – Entrée dans le lignage lymphoïde.....	61
II.2.B – Le réarrangement des immunoglobulines comme marqueur de la lymphopoïèse .....	62
II.2.C – Validation des réarrangements des immunoglobulines .....	65
II.2.C.a Validation des réarrangements IgH par le pré-BCR :.....	65
II.2.C.b Validation des réarrangements IgL par le BCR :.....	66
II.2.D – Signalisations moléculaires impliquées dans la différenciation B : .....	67
II.2.D.a Signalisation moléculaire induite par le récepteur à l’interleukine 7 : .....	67

1) Signal de survie cellulaire.....	68
2) Signal de prolifération cellulaire.....	70
II.2.D.b Signalisation moléculaire induite par le Pre-BCR :.....	71
1) Signal de prolifération cellulaire .....	71
2) Signal de différenciation cellulaire.....	72
II.2.D.c Signalisation moléculaire induite par le Cxcr4 :.....	74
1) Signal de différenciation cellulaire.....	74
2) Rôle de la niche hématopoïétique pour la disponibilité des ligands.....	75
II.2.E – Réseau de régulation transcriptionnelle de la différenciation B : .....	76
II.2.E.a Séquentialité de la régulation de l’engagement B.....	76
II.2.E.b Rôle de PAX5 dans la lymphopoïèse B .....	77
II.2.E.c Structure moléculaire du facteur de transcription PAX5 .....	78
II.2.E.d Cofacteurs de régulations de PAX5 .....	79
III/ Les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques B .....	81
III.1 - Informations cliniques de la pathologie.....	81
III.1.A - Généralités .....	81
III.1.B – Caractérisation des LAL-B.....	83
III.1.B.a Caractérisation phénotypique .....	83
1) Identifier le stade développemental de la leucémie.....	83
2) Identifier les marqueurs aberrants de la leucémie .....	84
III.1.B.b Caractérisation Moléculaire.....	86
Hyperdiploïdes .....	87
BCR-ABL.....	87
ETV6-RUNX1 .....	88
TCF3-PBX1 .....	89
KMT2A.....	89
Phi-like .....	90

Autre sous-type oncogéniques rares.....	91
III.1.B.c Altérations génétiques de PAX5 dans les LAL-B .....	93
III.2 Modèles murins de leucémogénèse B .....	95
III.2.A Etude des voies moléculaires impliquées dans la leucémogénèse .....	95
III.2.B – Etude de l’hétérogénéité intra-tumorale .....	97
III.3- A la recherche des cellules initiatrices des LAL-B.....	98
III.3.A – Le concept de la cellule souche leucémique .....	98
III.3.B - Diversité clonale des LAL-B : Approche génétique .....	99
III.3.C - Identification de cellules pré-leucémiques chez l’homme .....	99
III.3.D – Définition du modèle multi-étape des LAL-B .....	101
CONTEXTE ET TRAVAUX DE THESE.....	103
RESULTATS .....	106
Résumé graphique des résultats obtenus.....	148
DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS.....	149
Prendre avantage du phénotype aberrant des pré-CSLs pour leur identification chez l’Homme .....	149
La polarisation du pré-BCR permet-elle des divisions asymétriques pour maintenir l’activité des pré-CSLs ? .....	151
Le stress oncogénique induit-il une addiction aux signaux pro-survies.....	154
Contrebalancer la signalisation JAK/STAT par l’intermédiaire de BLNK .....	155
Détournement de la signalisation STAT5 en contexte de quiescence ?.....	156
La transformation leucémique est-elle dépendante d’un « priming » signalétique ?.....	156
Concomitance des processus de différenciation et de reprogrammation ? .....	157
Quiescence cellulaire : induite par l’oncogène, la différenciation ou conjointement ? .....	160
Etude des relations entre inflammation, quiescence cellulaire et pouvoir leucémogène... ..	160
Spécificité des propriétés des cellules souches ? .....	161
Ciblage thérapeutique de la quiescence cellulaire des pré-CSLs/cellules résistantes .....	162
Concept de la cellule persistante à long terme dans les LAL.....	163

PERSPECTIVES.....	168
Caractérisation phénotypique des pré-CSLs quiescentes PAX5-ELN.....	168
Criblage de petites molécules pour l'identification de nouvelles thérapies ciblées.....	168
Généralisation des résultats à d'autres modèles murins transgéniques de LAL-B .....	170
Identification des pré-CSLs au stade leucémique chez l'Homme.....	171
ANNEXES .....	174
.....	209
Bibliographie.....	210

## ABBREVIATION

5-FU	5-FluoUracile
ABL1	ABeLson gene
ADN	Acide Déoxyribonucléique
AGM	Aorte Gonade Mesonephros
ALP	All Lymphoid Progenitor
ARN	Acide Ribonucléique
ATAC-seq	Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing
BCAP	B Cell Adaptator Protein
BCR	B-Cell Receptor
BLNK	B-cell Linker Protein
BLP	Lymphoid Progenitor
Brdu	5'-Bromo-2'-deoxyuridine
CD	Cluster of Differentiation
cDC	classical Dendritic Cells
CDKN2A/2B	Cyclin Dependent Kinase inhibitor 2A/2B
CFSE	CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester
CFU-S	Colony-Forming Unit-Spleen
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CNIL	Comité National Informatique et Libertés
CoREST	CoRepressor for Element-1-Silencing Transcription Factor
CSH	Cellule Souche Hematopoiétique
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
CytoF	Cytometry by Time Of Flight
DEXA	Dexamethasone
DOXO	Doxorubicin
EBF1	Early B-cell Factor 1
EGR1	Early Growth Response 1
EHT	Transition endothélio-hematopoiétique
ELN	ELastiN
ERG	Ets-Regulated Gene
ES	Embryonic Stem cells

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Flt3	Fms Like Tyrosine kinase 3
FOXO1	Forkhead box protein O 1
FUCCI	Indicateur Fluorescent du Cycle Cellulaire basé sur l'Ubiquitylation
GFP	Green Fluorescent Protein
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GSVA	Gene Set Variation Analysis
GTPases	Guanosine TriPhosphate hydrolases
H2B	Histone 2B
HDAC	Histone DéACétylase
HINT	Hmm-based IdeNtification of Transcription factor footprints
IAHC	Clusters Endothéliaux Intra-Artériolaires
IC50	Inhibitrice Concentration 50
IgH	Immunoglobulin Heavy chain
IgL	Immunoglobulin Light chain
IKZF1	Ikaros family Zinc Factor 1
IL7R	Interleukin-7 Receptor
iPSCs	induced Pluripotent Stem Cells
IRF	Interferon Response Factor
ITAM	Immunorecepteur Tyrosine-based Activation Motif
JAK	Janus Kinase
KLF	Kruppel-Like Factor
KMT2A/MLL	Histone-lysine N-methyltransferase 2A
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
LAL-B	Leucémie Aigu lymphoblastique B
LAM	Leucémie Aigu Myéloide
LDA	Limit Dilution Assay
Lin	Lineage
LMPP	Lymphoid Multi-Potent Progenitor
LSK	Lineage <sup>-</sup> Kit <sup>-</sup> Sca <sup>-</sup>
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MPP	MultiPotent Progenitor

MTX	Metotrexate
MYC	Myelocytomatosis oncogene
Neo1	Neogenine1
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor Kappa B
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NLS	Nuclear Localization Signal
Ntn1	Netrin1
PAX5	Paired boX protein 5
Ph+	Philadelphia positive
PI3K	PhosphoInositide-3-Kinase
PIP2/PtdIns(4,5)P2	Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate
PIP3/PtdIns(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol 3,4,5 diphosphate
PLC $\gamma$ 2	PhosphoLipase C- $\gamma$ -2
Pre-BCR	Pre-B-Cell Receptor
Pre-CSLs	Cellules souches pré-leucémiques
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PU-1/Spi1	PU-box transcription factor / Spleen Focus Forming Virus
RA	Retinoic Acid
RAG	Recombination-Activating Gene
RITE	Recombinaisons Induites par Echangeur de Tag
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
Sc RNAseq	Single Cell RiboNucleotideAcide sequencing
Sca1	Stem Cell Antigen 1
Sc-ATAC-seq	Single Cell Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing
SCF	Stem Cell Factor
STAT	Signal and Transducer and Activator of Transcription
STAT5-CA	STAT5-Constitutive Activation
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TAD	TrAnsactivation Domain
TCF3/E2A	TransCription Factor 3
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TF	Transcription Factor



TFBS	Transcription Factor Binding Sites
TP53	Tumor Protein 53
TPO	ThromboPOiétin
TTA	Tétracycline régulable de TransActivation
UM171	University Montreal 171
UMAP	Uniform Manifold Analysis Projection
UPR	Unfold Protein Response
VCR	Vincristin
Vwf	Von willebrand factor
WHO	World Health Organization

*“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' but 'That's funny...’”*

Isaac Asimov

## **INTRODUCTION**

Mon introduction aura pour but d'aborder les éléments essentiels à la compréhension de mon sujet de thèse. Celui-ci a évolué autour des notions de fonctionnalités des cellules souches appliquées au contexte pathologique des leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B). C'est pourquoi je débiterai mon introduction sur l'explication des notions de base concernant l'hématopoïèse normale. J'y définirai les concepts qui existent autour de la cellule souche hématopoïétique (CSH) en m'attardant sur leur genèse, leur environnement puis leurs fonctionnalités. Je poursuivrai ensuite cette introduction en décrivant le processus de lymphopoïèse B se déroulant dans la moelle osseuse, en précisant les différentes signalisations moléculaires mises en jeu. Enfin, la partie suivante s'organisera autour du contexte pathologique des LAL-B. J'y exposerai tout d'abord la prise en charge clinique de la pathologie puis expliquerai les différents types d'hétérogénéités qu'elle regroupe : phénotypique, moléculaire et fonctionnelle. Je finirai sur la description du modèle théorique expliquant la leucémogénèse et sur le concept des cellules initiateuses à l'origine de la pathologie.

Cette introduction se fixe l'objectif non pas de l'exhaustivité des thèmes abordés mais plutôt d'explicitier les éléments de la littérature importants pour la compréhension des résultats que j'ai obtenus ainsi que de leur discussion.

# I/ Cellules souches hématopoïétiques

## I.1 Généralités sur l'hématopoïèse

Le domaine de l'hématologie tire ses origines des premières observations et caractérisations de cellules sanguines à l'aide d'un microscope en 1658 par les naturalistes Allemand Jam Swammerdam et Antoni van Leeuwenhoek ([Hajdu 2003](#)). Ils décrivent alors des formes particulières dites de « corpuscules rouges », correspondant aux globules rouges. Il faudra attendre 1843 pour que Gabriel Andral et William Addison définissent le sang comme une mixture de globules rouges et blancs ([Andral 1843](#)). Leurs travaux permirent de caractériser cytologiquement les différentes populations hématologiques sanguines. C'est ensuite l'observation de cellules hématopoïétiques morphologiquement différentes chez des patients qui suggéra l'existence de pathologies relevant du domaine de l'hématologie. Ces travaux précurseurs permirent de fonder les bases de nos connaissances sur l'hématopoïèse normale et pathologique.

### *I.1.A – Lignées hématopoïétiques*

L'hématopoïèse normale est définie comme un processus continu et finement régulé qui permet d'aboutir à la génération de l'ensemble des cellules matures du sang. Chaque cellule mature possède un rôle spécifique et collabore avec les autres cellules hématopoïétiques afin de permettre le maintien de l'homéostasie tissulaire. Elles remplissent des rôles variés tels que le transport de l'oxygène dans le sang, la défense immunitaire ou bien le contrôle de la fluidité sanguine. Chez l'Homme adulte, environ 400 à 500 milliards de cellules hématopoïétiques sont générées chaque jour. On discerne la moelle osseuse, siège de la production des cellules hématopoïétiques, de la circulation sanguine qui forme un réseau connectant les différents tissus de l'organisme. En effet, le tissu hématopoïétique est l'unique organe liquide chez les mammifères et possède des ramifications dans l'ensemble du corps.

On sépare communément l'ensemble des cellules hématopoïétiques en différents lignages ([Figure 1](#)). Le lignage lymphoïde regroupe les lymphocytes B qui se spécialisent dans la réponse humorale, les lymphocytes T qui participent à la réponse immunitaire adaptative, ainsi que les cellules NK, aussi appelées cellules lymphoïdes innées, qui possèdent une réponse cytotoxique face aux infections. Le lignage myéloïde est séparé en un compartiment granuleux, monocytaire, érythroïde et mégacaryocytaire. Les granulocytes sont des cellules participant à la réponse immunitaire innée en phagocytant les pathogènes ou en libérant des granules cytotoxiques. La lignée monocytaire est spécialisée dans la présentation d'antigènes pour les

cellules dendritiques ou dans la phagocytose pour les macrophages. Le lignage érythroïde produit à terme les érythrocytes, aussi appelés globules rouges, qui ont pour fonction d'oxygéner l'ensemble des tissus. Enfin, les mégacaryocytes sont les cellules produisant les plaquettes qui régulent la fluidité sanguine ainsi que l'hémostase primaire.

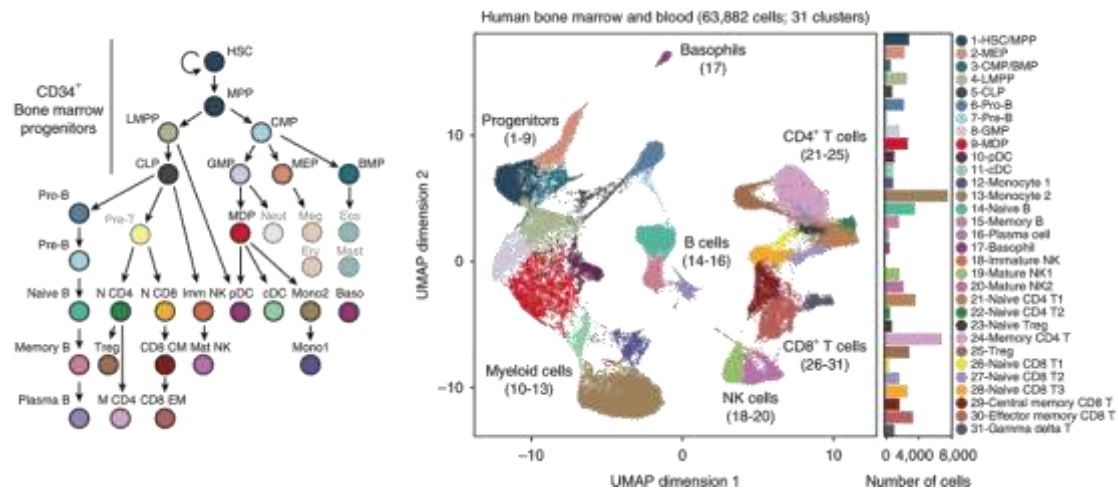


Figure 1 : Illustration schématique du processus hématopoïétique humain à l'origine de l'ensemble des différents lignages (*Panel de gauche*). Réduction dimensionnelle en UMAP de données de Sc-ATACseq de l'ensemble de l'hétérogénéité hématopoïétique du sang et de la moelle osseuse chez l'homme (*Panel de droite*). (D'après [Satpathy et al. 2019](#))

### 1.1.B – Concept de la cellule souche hématopoïétique :

Une cellule souche hématopoïétique (CSH) est capable de générer l'ensemble de la diversité du tissu hématopoïétique grâce à des caractéristiques fonctionnelles qui lui sont propres. Ces caractéristiques furent initialement observées il y a 60 ans par des expériences de transplantation. En effet, la transplantation de cellules hématopoïétiques dans des souris irradiées de façon létale permet la formation de colonies visibles à l'œil nu sur leurs rates ([Till & McCULLOCH 1961](#)). Ces colonies, nommées « colony-forming unit spleen » (CFU-S) sont constituées de différents lignages hématopoïétiques et amenèrent l'hypothèse qu'elles provenaient d'un unique progéniteur commun. Leurs observations fondèrent les premières notions associées à la biologie des cellules souches et à leur étude par des tests fonctionnels. Ces travaux débouchèrent sur l'identification des CSHs, qui furent les premières cellules souches spécifiques d'un tissu isolé ([Spangrude et al. 1988](#)) et utilisées en clinique ([Weissman 2000](#)).

### 1.1.C – Développement hématopoïétique embryonnaire

Chez les vertébrés, le réservoir de CSHs est originellement généré pendant l'embryogenèse et perdure jusqu'à leurs morts. L'émergence des CSHs se localise dans l'aorte

gonade mésonéphros (AGM) à partir de 10.5 post conception chez la souris (Boisset et al. 2010) et 4 semaines chez l'Homme (Ivanovs et al. 2011). Les CSHs générées dans l'AGM vont ensuite se localiser dans le foie fœtal à partir de 14.5 jours post conception chez la souris et 12 semaines chez l'Homme. Elles y subissent une phase d'intense prolifération permettant de multiplier leur nombre jusqu'à 38 fois (Ema & Nakauchi 2000). Un modèle d'ontogenèse fut développé pour expliquer l'origine précise des CSHs et les mécanismes moléculaires permettant de les engendrer (Figure 2). Dans l'AGM, des cellules endothéliales artériolaires réalisent une transition endothélio-hématopoïétique (EHT) (Dzierzak & Bigas 2018). Cette dernière va favoriser la mise en place de bourgeonnements cellulaires appelés clusters endothéliaux intra-artériolaires (IAHCs). Les IAHCs de la paroi ventrale de l'AGM subissent une signalisation spécifique leur permettant de s'orienter vers le lignage hématopoïétique et donc de former les CSHs. Il est décrit que le facteur de transcription RUNX1 est le premier marqueur spécifique de l'engagement vers le lignage hématopoïétique (Burns et al. 2005). En effet, les modèles transgéniques murins délétés pour Runx1 dès le stade embryonnaire ne sont pas capables de former des cellules hématopoïétiques par EHT (Chen et al. 2009). L'EHT est associée à la régulation fine de différentes voies de signalisation. Cette régulation implique une balance entre d'une part la voie du TGFb/BMP et la voie Wnt, et d'autre part celle de l'acide rétinoïque associée à la voie JAK-STAT (Figure 2). Ce shift dans le paysage signalétique semble nécessaire pour spécialiser des cellules de l'IAHCs à un devenir hématopoïétique chez l'Homme (Calvanese et al. 2022) et la souris (Hou et al. 2020; Fadlullah et al. 2022). Il est démontré que ces signalisations passent par l'intermédiaire de différents récepteurs à activité tyrosine kinase dont le récepteur Kit, qui est reporté comme impliqué dans la mise en place définitive des CSHs (Azzoni et al. 2018; Balounová et al. 2019).

La génération des CSHs lors de l'embryogenèse a été longtemps considérée importante pour participer à la production des différents lignages hématopoïétiques. Cependant, une étude récente indique que les CSHs ne participent que de façon négligeable à l'hématopoïèse fœtal (Yokomizo et al. 2022). Les auteurs démontrent que des progéniteurs hématopoïétiques moins souches sont générés lors de l'EHT et qu'ils sont à l'origine des cellules hématopoïétiques de l'embryogenèse. Les résultats démontrent donc que l'activité des CSHs n'est pas nécessaire au stade embryonnaire. La génération de cellules sanguines indépendamment des CSHs est soulignée par d'autres observations. En effet, il est décrit qu'une première vague de production de progéniteurs érythroïdes prend place dans le sac vitellin à 7.5 jours post conception chez la souris (Palis et al. 1999). Ces érythrocytes sont générés indépendamment de la mise en place

des IAHCs (Soares-da-Silva et al. 2021). Leur production précoce a pour rôle de transporter l’oxygène efficacement dans l’embryon car celui-ci atteint une taille trop importante pour que l’oxygénation se fasse par simple diffusion.

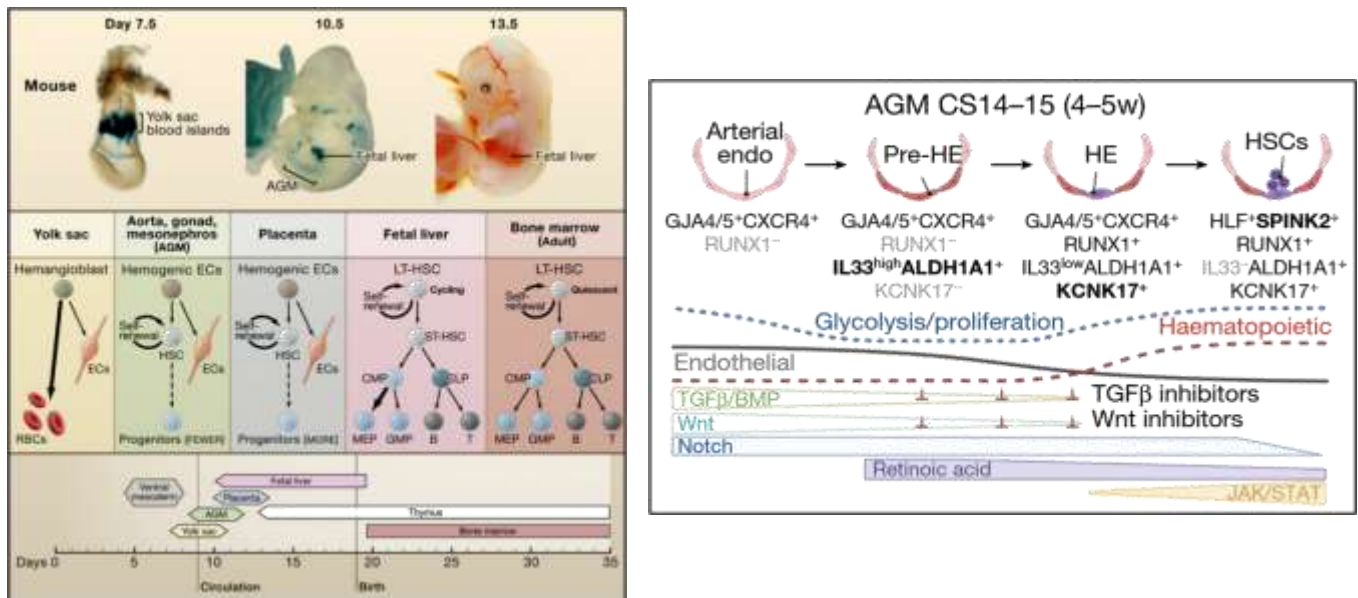


Figure 2 : Représentation du développement hématopoïétiques fœtal et de sa localisation chez la souris (*Panel de gauche*). Schéma de la transition endothélio-hématopoïétique et des signalisations moléculaires mises en jeu chez l’homme (*Panel de droite*). (D’après Orkin & Zon 2008 et Calvanese et al. 2022)

### 1.1.D - Micro-environnement de la moelle osseuse

Bien que les CSHs colonisent le foie fœtal pendant l’embryogenèse, elles migrent ensuite vers la moelle osseuse qui correspond à leur région de résidence finale. Les CSHs commencent leur migration avant la naissance pour arriver dans un environnement médullaire en pleine transformation (Coşkun et al. 2014; Liu et al. 2022). Il est en effet décrit que la colonisation des cellules hématopoïétiques dans la moelle des os long a lieu lors de la croissance de l’os. Les os longs font partie des environnements médullaires comportant le plus de cellules hématopoïétiques. Ils sont constitués du fémur, du tibia et du péroné de chaque jambe (patte inférieure) ainsi que de l’humérus, le cubitus et le radius de chaque bras (patte supérieure). Après la naissance, les os longs continuent de croître à partir de la métaphyse de l’os. La métaphyse correspond à la région située entre l’épiphyse (tête de l’os) et la diaphyse (centre de l’os) et possède une composition cellulaire qui lui est propre. Le terme de niche hématopoïétique vient de l’hypothèse que les propriétés des CSHs sont régulées et maintenues par leurs cellules environnantes (Schofield 1978). Pour étayer à cette hypothèse, des essais de co-culture de cellules adhérentes en présence de CSHs ont été réalisés afin de maintenir des

CSHs *in vitro*. Une diversité de types cellulaires ont été testés tels que des macrophages, des adipocytes, des cellules endothéliales ainsi que des fibroblastes (Dexter et al. 1977; Penn et al. 1993). Ils permirent notamment de souligner l'importance de la protéine membranaire DLK1 ainsi que des cytokines « Stem cell Factor » (SCF) et thrombopoïétine (TPO) dans la maintenance des CSHs (Ramsfjell et al. 1996; Moore et al. 1997).

Le développement des outils de microscopie a rendu possible la visualisation *in vivo* des CSHs et de leur micro-environnement, ainsi que la compréhension de l'organisation de la moelle osseuse (Figure 3). L'environnement médullaire est très largement vascularisé, et ce par deux types de vaisseaux : les artérioles et les sinusoides. Au centre de l'os se situe le sinus central qui correspond à une zone médullaire très oxygénée et qui permet de définir un gradient décroissant d'oxygène à mesure que l'on se rapproche de l'os. Différents travaux indiquent que ce gradient d'oxygène est important dans la régulation de l'activité métabolique des cellules hématopoïétiques et notamment des CSHs (Ito et al. 2006; Arai & Suda 2007; Itkin et al. 2016). Ce gradient, associé à la présence d'ostéoblastes et d'ostéoclastes au niveau de l'os, permet de définir la niche endostéale. La niche périvasculaire, quant à elle, correspond à l'environnement proche des deux types de vaisseaux. Elle s'individualise en une niche artériolaire et une niche sinusoidale (Figure 3). La niche artériolaire est caractérisée par l'association des cellules endothéliales avec des cellules réticulaires NG2+, des cellules de Schwann et possède une innervation sympathique. Différents travaux incriminent cette niche dans la maintenance de la dormance des CSHs (Kunisaki et al. 2013). Les modèles transgéniques empêchant la génération des cellules réticulaires NG2+ ou des approches de dénervation chirurgicale des artérioles ont validés l'importance de la niche artériolaire dans la maintenance des CSHs (Maryanovich et al. 2018). La niche sinusoidale est composée des sinusoides associées à des cellules réticulaires LEPR+ spécialisées dans la sécrétion de chimiokines et cytokines telles que le CXCL12, l'IL7, le SCF et l'IGF1. Il est démontré que la lymphopoïèse B précoce est particulièrement dépendante de la niche péri-sinusoidale (Cordeiro Gomes et al. 2016). Dans l'ensemble, la combinaison de toutes ces micro-niches permettent de fournir l'ensemble des environnements signalétiques nécessaires au développement des cellules hématopoïétiques.



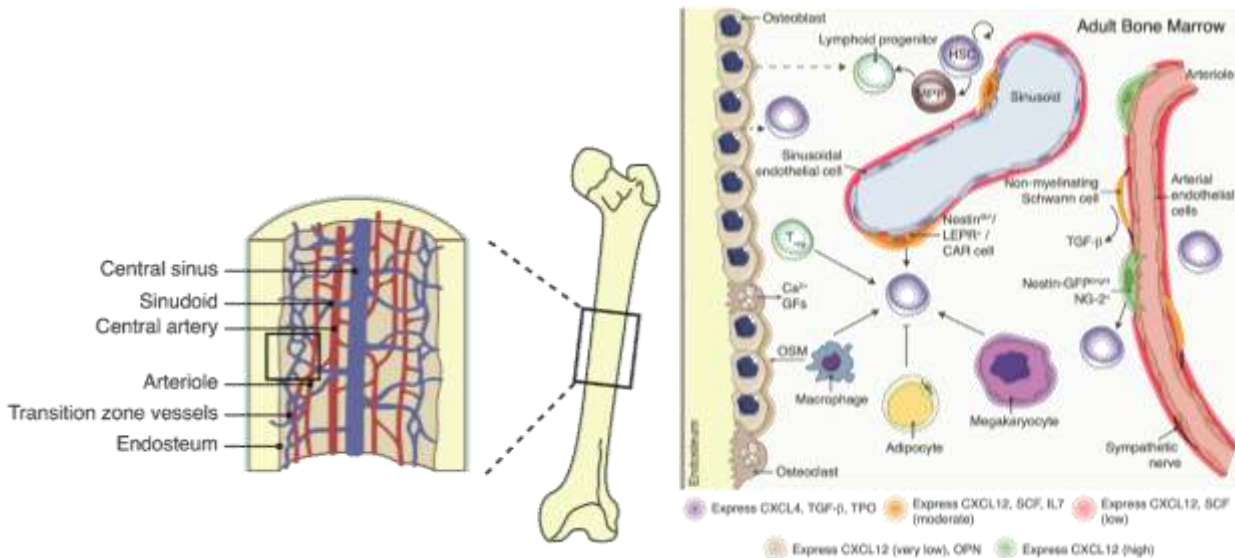


Figure 3 : Organisation de la moelle osseuse et de sa vascularisation (*Panel de gauche*). Composition des différentes niches hématopoïétiques de la moelle osseuse (*Panel de droite*). (D'après Soares-da-Silva et al. 2020)

## I.2 / Propriétés fonctionnelles de la cellule souche hématopoïétique

A partir de la naissance, les cellules souches doivent perdurer tout le long de la vie de l'organisme tout en régénérant leur tissu associé, si besoin. Pour permettre cela, il est démontré que différentes propriétés physiologiques sont cruciales dans le maintien de la fonction des CSHs. Il s'agit de la quiescence/dormance cellulaire, de l'auto-renouvellement et enfin de la plasticité cellulaire. Ces propriétés permettent aux CSHs de se placer au sommet du processus de l'hématopoïèse. Un modèle hiérarchique fut initialement imaginé pour décrire l'hématopoïèse (Figure 4). Il correspond à l'acquisition progressive d'un programme moléculaire vers différents lignages indépendants, ou chaque progéniteur n'aura qu'un choix limité (bimodal) dans la différenciation. Cependant, ce modèle reposait sur l'isolement de cellules prédéfinies phénotypiquement par cytométrie en flux. Il fut mis en contradiction par des approches plus récentes d'analyses moléculaires à l'échelle de la cellule unique (Sc-RNAseq, Sc-ATAC-seq et méthode de tracking) qui établissent un modèle de processus continu de différenciation (Figure 4). Ainsi, les CSHs et les progéniteurs les plus précoces réduisent peu à peu leur potentiel de différenciation sans réaliser de transition abrupte pour un lignage donné (Velten et al. 2017). Il est alors plus juste de considérer un gradient de propriétés souche décroissant à partir des CSHs.

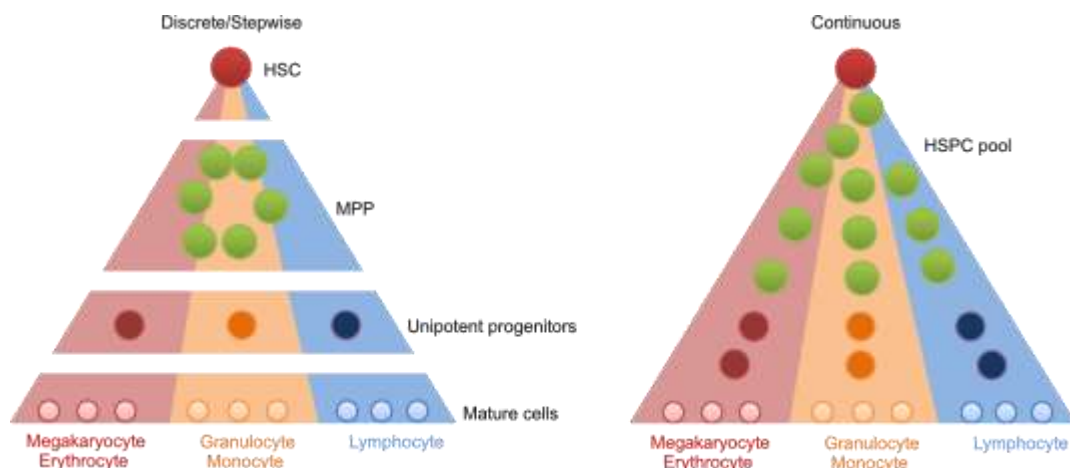


Figure 4 : Représentation Schématique du modèle hiérarchique ou continue de l'hématopoïèse. (D'après Cheng et al. 2020)

Chez la souris, le compartiment des progéniteurs les plus précoces est nommé LSK (Lin- Sca+ Kit+). Il contient les CSHs et les progéniteurs hématopoïétiques multipotents les plus immatures. Il est possible de subdiviser ces sous-populations selon l'expression de marqueurs spécifiques de surface par cytométrie en flux. Ces progéniteurs sont reportés comme possédant un biais de différenciation pour un lignage spécifique (Cabezas-Wallscheid et al. 2014; Pietras et al. 2015). Cela signifie que le progéniteur peut encore générer différents lignages hématopoïétiques mais qu'il aura une probabilité plus importante d'en générer un en particulier. Ainsi, les MPP4 (LSK CD135<sup>+</sup> CD48<sup>+</sup> CD150<sup>-</sup>) sont orientées vers le lignage lymphoïde, les MPP2 (LSK Cd135<sup>-</sup> CD48<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup>) vers le lignage erythro-megakaryocytaire et les MPP3 (LSK Cd135<sup>-</sup> CD48<sup>+</sup> CD150<sup>-</sup>) vers le lignage myéloïde. A ces trois types de progéniteurs se rajoutent les CSHs à long termes (LSK Cd135<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>) et à court terme (LSK Cd135<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup> CD150<sup>-</sup>) qui sont capables de générer l'ensemble des lignages hématopoïétiques de façon homogène (Figure 5).

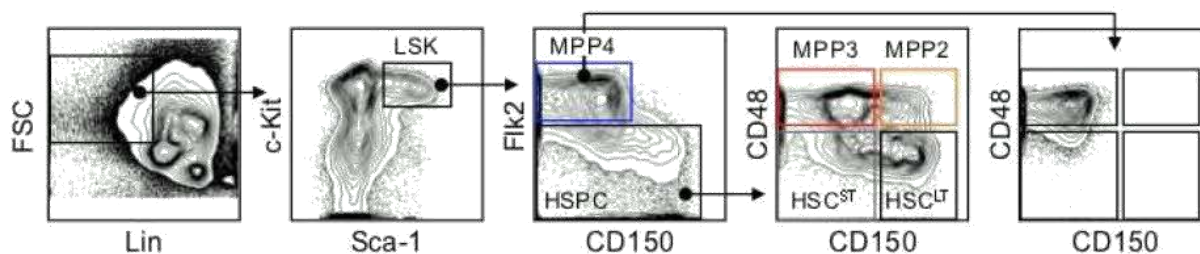


Figure 5 : Stratégie de fenêtrage permettant de phénotyper les progéniteurs les plus précoces de l'hématopoïèse murine (LSK). (D'après Cabezas-Wallscheid et al. 2014).

## *I.2.A – De la quiescence à la dormance cellulaire : comment retarder l'épuisement des CSHs*

### *I.2.A.a Définition*

La prolifération cellulaire est le processus qui conduit à générer deux cellules filles à partir d'une cellule mère. Il est défini par la progression des cellules dans le cycle cellulaire qui se constitue de 4 grandes phases : G1 (interphase), S (synthèse d'ADN) ; G2 (interphase) et enfin M (mitose) (Malumbres & Barbacid 2009). De nombreuses études indiquent que la prolifération peut être délétère pour la pérennité de la cellule. En effet, elle peut induire un stress cellulaire pouvant aboutir à l'apoptose. De plus, la phase de mitose se définit par une duplication du matériel génétique qui peut conduire à des anomalies de réplication. Enfin, chaque cellule possède une limite intrinsèque au nombre maximum de divisions qu'elle peut réaliser. Cette limite est causée par le raccourcissement des télomères après chaque division qui aboutit à terme à la sénescence des cellules (Victorelli & Passos 2017). Chaque cycle cellulaire peut être entrecoupé par une entrée en phase G0 qui marque une pause, plus ou moins longue selon le type cellulaire, entre plusieurs cycles de prolifération. Lors de l'embryogenèse, les cellules souches subissent une importante phase de prolifération dans le foie fœtal (Song et al. 2007) qui s'estompe deux à trois semaines après la naissance (Li et al. 2020). Elles deviennent alors majoritairement quiescentes, dans un stade non-divisant G0.

Comme dit précédemment, afin de préserver l'homéostasie et l'intégrité du tissu hématopoïétique, une CSH doit remplir son rôle biologique le plus longtemps possible. C'est pourquoi l'organisme limite au maximum leur prolifération en induisant leur inactivité cellulaire par un statut de dormance. Cette dormance se dissocie de la quiescence cellulaire par la durée nécessaire pour une nouvelle entrée en cycle. En effet, la quiescence est considérée comme un état intermédiaire et transitoire, alors que la dormance est associée à un état stable dans le temps, qui nécessite un stimulus important pour sortir peu à peu de cet état (Wilson et al. 2009; Cabezas-Wallscheid et al. 2017). La transition d'un état de dormance à un état de quiescence/mobilisation cellulaire est un processus finement régulé par une large diversité de signaux de recrutement (Li 2011) et de maintien de quiescence, que je vais introduire par la suite.

### **1) Facteurs extrinsèques**

Il est décrit que certaines cytokines telles que celles de la famille des interférons de type 1 sont capables de provoquer la sortie de dormance des CSHs *in vivo*. Une fois activées, les CSHs présentent un niveau plus élevé d'expression de la protéine de surface Sca1 (Ly6a) ainsi qu'une induction de la phosphorylation de Stat1 (Essers et al. 2009). L'utilisation de modèles murins délétés pour ces deux gènes a confirmé que l'induction de la prolifération des CSHs par l'interféron alpha était dépendante de ces deux protéines (Durbin et al. 1996; Ito et al. 2003). Mis ensemble, ces études ont permis de décrire précisément la voie de signalisation des interférons de type 1 chez la CSH (Figure 6). L'induction de la prolifération des CSHs est décrite pour d'autres cytokines pro-inflammatoires, telles que le G-CSF (Schuettpelez et al. 2014), l'Il1b (Pietras et al. 2016), le TNF $\alpha$  (Yamashita & Passegué 2019), mais aussi en réponse au LPS ou en condition myéloablatrice après traitement au 5-FU (Wilson et al. 2008). Ces mécanismes de recrutement sont décrits comme des stress inflammatoires aigus.

Cependant, des stimulations chroniques avec les mêmes cytokines pro-inflammatoires ne semblent pas aboutir à des résultats comparables. En effet, des études montrent que la stimulation chronique aux interférons de type I a un rôle pro-aplasique, liée à la réduction du nombre de cellules matures dans la moelle osseuse ainsi qu'à la capacité des progéniteurs hématopoïétique à proliférer (Young & Maciejewski 1997; Lin et al. 2014). Il est décrit que les stimulations chroniques ne permettent pas de mettre les CSHs en cycle continuellement et qu'après quelques divisions, les CSHs retournent en dormance et ne semblent plus stimulables. Ce mécanisme de retour en dormance semble protéger les CSHs de l'apoptose induite par la stimulation chronique des interférons de type I. Ce résultat est corroboré par le fait que lorsque les CSHs sont forcées à proliférer conjointement avec une stimulation chronique à l'IFN $\alpha$ , un signal pro-apoptotique est transduit dans les CSHs (Pietras et al. 2014). De plus, les stimulations chroniques sont associées à une perte de fonctionnalités des CSHs, que cela soit au niveau de leurs capacités d'auto-renouvellement, de différenciation, ou de leur capacité à réaliser des divisions asymétriques (Bogeska et al. 2022). Ces résultats soulignent qu'un état de dormance cellulaire n'est pas forcément associé à une meilleure fonctionnalité de la CSH. Il est donc considéré que la réponse à des événements inflammatoires trop fréquents et/ou trop importants induit l'épuisement fonctionnel des CSHs.

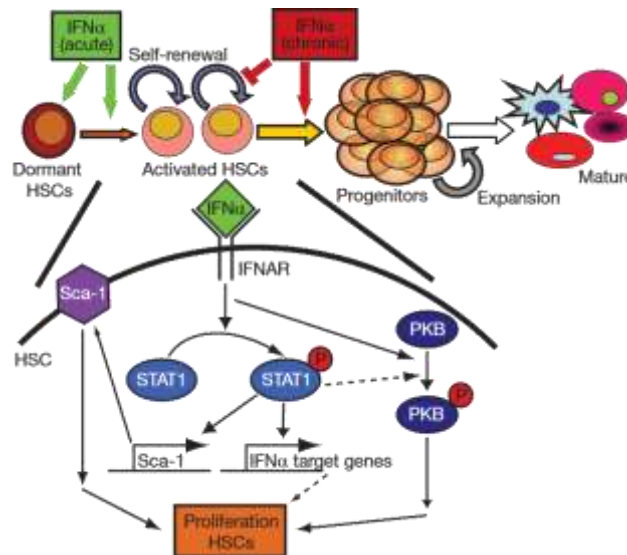


Figure 6 : Illustration schématique de la signalisation moléculaire en aval de l'interféron alpha permettant de recruter une CSH. (D'après [Essers et al. 2009](#))

## 2) Facteurs intrinsèques

L'étude des facteurs de transcription impliqués dans l'activation de la prolifération des CSHs a démontré l'importance de Myc dans ce mécanisme. En effet, il est reporté que Myc est traduit après une stimulation aiguë à l'interféron alpha, lui permettant ainsi une activité transcriptionnelle ([Ehninger et al. 2014](#)). Les CSHs expriment deux isoformes de Myc : c-Myc et n-Myc. L'isoforme n-Myc est décrite comme particulièrement spécifique des CSHs ([Laurenti et al. 2008](#)). La délétion des deux isoformes de Myc dans les CSHs est associée à la perte des CSHs proliférantes mais pas à celle des CSHs dormantes. De plus, les modèles d'inactivations conditionnelles de c-Myc ([Wilson et al. 2004](#)) ou du super-enhancer contrôlant son expression ([Bahr et al. 2018](#)) indiquent que les progéniteurs hématopoïétiques les plus précoces (hormis les CSHs) deviennent incapables de participer à la suite du processus hématopoïétique. Ces résultats révèlent le lien qu'il existe entre capacité de prolifération et de différenciation dans l'hématopoïèse normale et soulignent l'importance de Myc dans ce processus. Certaines protéines du cycle cellulaire ont aussi été incriminées dans la régulation de la sortie de dormance. En effet, le niveau d'expression protéique de régulateurs du cycle cellulaire tel que CDK6 est déterminant dans le contrôle de la cinétique de sortie de dormance. Chez l'Homme, les CSHs qui expriment un haut niveau de CDK6 au moment d'une stimulation de recrutement, sont plus rapides à entrer dans le cycle cellulaire ([Laurenti et al. 2015](#)). Chez la souris, la stimulation aiguë à l'interféron induit fortement l'expression de Cdk6 et permet l'entrée dans le cycle cellulaire. Les modèles murins invalidés pour le gène *Cdk6* ne présentent pas de défaut hématopoïétique à l'état d'équilibre, ce qui suggère que Cdk6 possède un rôle spécifique en réponse aux conditions

de stimulations. L'action de Cdk6 est démontrée comme permettant l'inhibition de l'expression de Egr1 (Scheicher et al. 2015), un facteur de transcription clé dans le maintien de la dormance des CSHs. Plus récemment, une étude indique que EGR1 et MYC partagent de nombreuses cibles transcriptionnelles mais les régulent de façon opposée au sein des CSHs humaines (Stoddart et al. 2022).

### 1.2.A.c Mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de la dormance des CSHs

#### 1) Facteurs extrinsèques

A l'inverse, il existe des voies moléculaires permettant l'induction ou le maintien de la dormance des CSHs. Celles-ci s'opposent aux signaux de recrutement des CSHs et permettent de réguler finement leur engagement. Il s'agit d'une balance signalétique étroitement régulée dont la disruption peut aboutir à l'épuisement du pool de CSHs. Parmi les signalisations incriminées dans le maintien de la dormance, celle de l'acide rétinoïque a été démontrée comme restreignant l'activité de biosynthèse globale des CSHs (Cabezas-Wallscheid et al. 2017). Les CSHs utilisent une voie alternative pour la signalisation de l'acide rétinoïque qui nécessite l'action de l'enzyme Cyp26b1 (Figure 7). Cette enzyme permet la production du métabolite 4-oxo-RA qui active le facteur de transcription Rarβ afin d'induire un programme transcriptionnel de dormance (Schönberger et al. 2022).

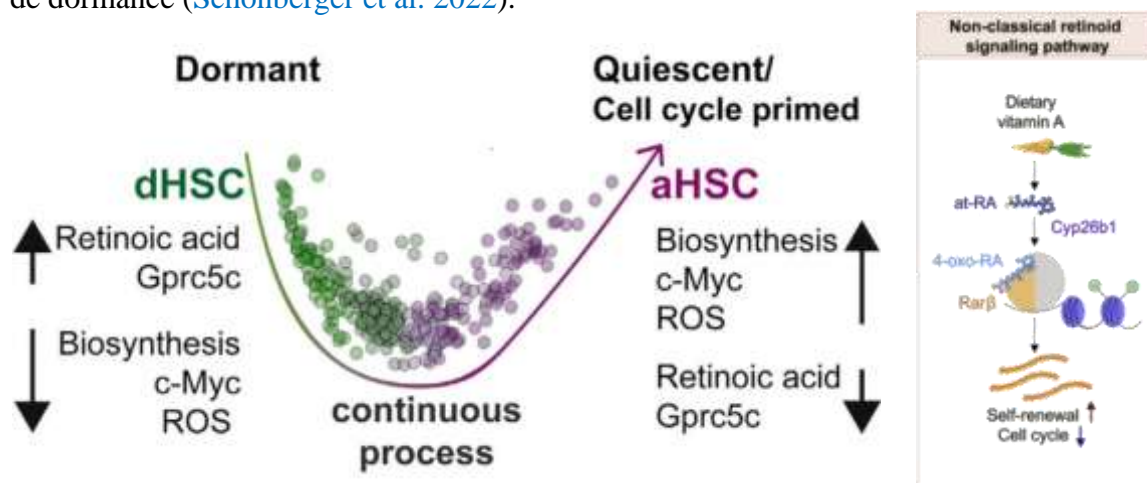


Figure 7 : Schéma représentant le processus continu de sortie de dormance des CSHs et incriminant différentes signalisations associées au maintien de dormance ou à l'engagement vers la quiescence (Panel gauche). Schéma de la voie non classique de l'acide rétinoïque induisant la dormance dans les CSHs (Panel droite). (D'après Cabezas-Wallscheid et al. 2017, Schönberger et al. 2022)

D'autres voies de signalisation sont impliquées dans le maintien de la quiescence des CSHs telles que les signalisations induites par le TPO (Qian et al. 2007) et le TGFβ (Yamazaki et al. 2009; Wang et al. 2018). Le thrombopoïétine (TPO) est une cytokine se liant au récepteur MPL. Ce dernier fut originalement décrit pour son rôle clé dans la différenciation mégacaryocytaire.

L'expression du récepteur MPL chez les CSHs et l'activation de sa signalisation permettent de discriminer les CSHs proliférantes des CSHs quiescentes *in vivo* (Yoshihara et al. 2007). La production de TPO est spécifique des ostéoblastes, ce qui suggère que certaines niches hématopoïétiques sont impliquées dans la régulation de l'activation du recrutement des CSHs. Cette notion est corroborée par d'autres travaux qui soulignent l'importance des niches artériolaires et endostéales pour le maintien de la quiescence des CSHs (Kunisaki et al. 2013). En aval de l'activation du récepteur Mpl par la Tpo, il est décrit que les CSHs activent la voie PI3K-AKT, ce qui permet la translocation nucléaire de NfκB qui se lie au promoteur de la galectine 3 (Gal3). Une fois traduit, Gal3 est transloqué dans le noyau de la cellule et favorise l'expression de l'inhibiteur de cycle cellulaire p21 (Jia et al. 2021). Des effets pro-quiescence sont donc rapportés par l'action de facteurs solubles telles que les cytokines précédemment mentionnées, mais aussi par des molécules de la matrice extra-cellulaire. En effet, la netrine-1 (Ntn1) est une protéine de la niche artériolaire qui se lie à son récepteur Neo1 (neogenine1). Neo1 est une des protéines les plus spécifiques des CSHs. Elle fait partie de la signature MoLO qui décrit les CSHs les plus fonctionnelles (Wilson et al. 2015). De plus, son expression est diminuée en cas de stimulation aiguë avec des agents pro-inflammatoires tels que le pIpC ou le LPS. L'interaction Neo-Ntn1 induit la répression de Cdk6 et l'activation de Egr1 dans les CSHs, permettant par ce mécanisme de maintenir leur dormance (Renders et al. 2021). Conjointement prouvé chez l'Homme et la souris, l'interaction entre l'acide hyaluronique et son récepteur GPRC5C joue aussi un rôle crucial dans la préservation de la dormance des CSHs *in vivo* (Zhang, Mess, et al. 2022).

## 2) Facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques associés au maintien de la quiescence des CSHs ont été identifiés à l'origine par des analyses moléculaires de cinétique post-myéloablation par 5-FU (Venezia et al. 2004). Cette approche permet notamment de discriminer que les facteurs de transcription Fos, Fosb et Egr1 étaient drastiquement inhibés en cas d'activation. La mise en place du modèle murin invalidé pour Egr1 démontre que les CSHs perdent leur état de quiescence et augmentent significativement leur activité de prolifération (Min et al. 2008). Les auteurs reportent aussi que les CSHs Egr1<sup>-/-</sup> se retrouvent plus facilement dans la circulation sanguine, suggérant que la perte de quiescence des CSHs est liée à une modification de leur rétention dans la niche hématopoïétique. Une étude menée dans les cellules souches neuronales (CNS) corrobore la notion que Egr1 pourrait réguler/être régulé par des interactions avec le micro-environnement. Les auteurs démontrent qu'une haute densité d'interaction impliquant les CNS

et leur micro-environnement, induit spécifiquement l'expression de Egr1 qui est cruciale pour le maintien de leurs propriétés souches (Baek et al. 2022). Aussi, le facteur de transcription Atf3 est reporté pour posséder un rôle similaire à celui de Egr1 dans les CSHs. En effet, bien que dispensable à l'état d'équilibre, son absence en cas de stimulation aiguë conduit à la perte du pool de CSHs. L'approche de 5FU utilisée dans l'article de Venezia permet aussi de discriminer que la voie JAK/STAT est impliquée dans le retour à l'état de quiescence des CSHs. Corroborant ce résultat, la délétion conditionnelle de Stat5 entraîne une perte progressive du pool de CSHs quiescents (Wang et al. 2009). L'activation de la voie JAK/STAT dans les CSHs implique différents récepteurs tyrosine kinase tels que c-kit et Mpl.

### 1.2.A.d Approches expérimentales permettant l'étude de la quiescence

Afin de déterminer expérimentalement la quiescence/dormance cellulaire, il est nécessaire de s'intéresser aux différentes approches utilisées pour caractériser le cycle cellulaire (Table 1). Ces techniques permettent au choix de mesurer si la cellule est en cycle ou non, de connaître dans quelle phase du cycle elle se trouve ou enfin de mesurer le nombre de mitoses réalisées en un temps donné.

Label	Labeling method	Labeling period	Chasing period	References	Label detection	Advantage	Disadvantage
Hoechst/Kit67	Ex vivo staining	n.a.	n.a.	Wilson et al., 2004	Direct fluorescence emission and antibody	<ul style="list-style-type: none"> <li>Simple and efficient labeling</li> <li>Clear separation of cell cycle phase</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Snapshot analysis at a single time point</li> <li>No possibility of subsequent functional testing of the labeled cells</li> </ul>
Hoechst/Pyronin Y	Ex vivo staining	n.a.	n.a.	Gothot et al., 1997; Passegue et al., 2005	Direct fluorescence emission	<ul style="list-style-type: none"> <li>Simple and efficient labeling</li> <li>Clear separation of cell cycle phase</li> <li>Possibility for functional test of the labeled cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Snapshot analysis at a single time point</li> </ul>
BrdU	In vivo intraperitoneal injection and drinking water with BrdU	180 d 10 d 13 d	180 d 120 d 300 d	Cheshier et al., 1999 Kiel et al., 2007 Wilson et al., 2008	Antibody	<ul style="list-style-type: none"> <li>Simple and efficient labeling</li> <li>In vivo cell cycle kinetics tracking</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No possibility of subsequent functional testing of the stained cells</li> <li>Low divisional resolution</li> <li>Mitogenic effect</li> </ul>
H2B-GFP (Tet-off)	In vivo transgene induction	Until doxycycline treatment	240 d 84 d	Wilson et al., 2008 Challen and Goodell, 2008	Direct fluorescence emission	<ul style="list-style-type: none"> <li>In vivo cell cycle kinetics tracking</li> <li>Possibility of functional testing of the labeled cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inconsistent labeling efficacy reported in different papers</li> <li>Promiscuous and dim H2B-GFP expression</li> </ul>
H2B-GFP (Tet-on)	In vivo transgene induction with doxycycline-containing drinking water	42 d	500 d	Fouill et al., 2009	Direct fluorescence emission	<ul style="list-style-type: none"> <li>In vivo cell cycle kinetics tracking</li> <li>Efficient labeling</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Unknown divisional resolution although seven to eight divisions assumed</li> </ul>
Esterized biotin	In vivo intravenous injection	Single dose	21 d	Nygren and Bryder, 2008	Streptavidin	<ul style="list-style-type: none"> <li>In vivo cell cycle kinetics tracking</li> <li>Simple and efficient labeling</li> <li>Possibility of functional testing of the labeled cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Low divisional resolution (lower than four divisions)</li> </ul>
CFSE	Ex vivo labeling	7 min	147 d	Takizawa et al., 2011	Direct fluorescence emission	<ul style="list-style-type: none"> <li>In vivo cell cycle kinetics tracking</li> <li>High divisional resolution (seven divisions)</li> <li>Simple and efficient labeling</li> <li>Possibility of functional testing of the labeled cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Intravenous transfer of ex vivo labeled cells</li> <li>Fluorescence bleaching</li> <li>Limited engraftment of cells in non-conditioned recipients</li> </ul>

Table 1 Avantages et désavantages des méthodes de quantification de la quiescence des CSHs (D'après Nakamura-Ishizu et al. 2014)



## 1) Caractérisation par mesure unique

Le premier type d'approche se base sur la mesure à un temps unique du contenu en ADN, ARN ou en protéine du cycle cellulaire d'une cellule. Un marquage pour la protéine Ki-67, discriminant les cellules en prolifération, combiné à un composé marquant le contenu en ADN, est fréquemment utilisé pour séparer les différentes phases du cycle cellulaire. Ces approches ont montrées les CSHs comme majoritairement en phase G0 (>70% des cellules) (Wilson et al. 2008). Il est aussi possible de mesurer le rapport entre contenu en ADN par le marqueur Hoeschst, et celui en ARN par la Pyronine Y (Gothot et al. 1997). Cette combinaison de marqueurs permet l'identification d'une population quiescente représentant 60% des CSHs. Les CSHs quiescentes sont également reportées comme ayant une haute activité d'efflux pour de colorants tel que le Hoeschst. Cette propriété fut utilisée afin d'identifier spécifiquement les CSHs quiescentes. Les cellules discriminées par cette méthode sont nommées « *side population* » et correspondent à 50% de l'ensemble des CSHs (Lin & Goodell 2006). Cependant, ces approches ne permettent pas de mesurer la durée de la phase G0 d'une cellule et donc la dormance cellulaire. De plus, il est démontré que parmi les CSHs en prolifération, certaines possèdent encore une haute fonctionnalité leur permettant, par exemple, de greffer à long terme (Goldberg et al. 2014). Ces constats pointent les limites d'une unique mesure pour étudier la dormance cellulaire, qui correspond à un haut niveau de quiescence.

## 2) Caractérisation par rétention de signal

La quiescence cellulaire est définie par l'absence d'activité de prolifération cellulaire. La quantification et visualisation de différents niveaux de quiescence n'est alors possible que par la prise en compte d'une cinétique de division (ou d'absence de division) cellulaire. C'est sur ce principe que se base les approches de rétention de signal. Le *5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester* (CFSE) ainsi que ses analogues (CTV ou CTB) sont des molécules fluorescentes lipophiles qui, après clivage par les estérases intra-cellulaires, vont se lier de façon covalente à toutes les protéines de la cellule. Ce faisant, après chaque division, les cellules traitées dilueront leur matériel protéique et le signal associé par deux. La perte du signal fluorescent sera donc proportionnelle au nombre de division réalisées dans un temps donné. Cette approche nécessite un traitement *ex vivo* des cellules d'intérêts, suivi d'une mise en culture *in vitro* ou bien d'une transplantation *in vivo* dans des souris receveuses (Takizawa et al. 2011). Comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit, la mise en culture des CSHs ou bien leur transplantation ne sont pas sans conséquence car elles induisent leur sortie de

dormance. L'utilisation du CFSE ne permet donc pas d'analyser en condition d'équilibre la dormance des CSHs.

C'est pourquoi, afin d'étudier la dormance à l'état d'équilibre, la mesure *in vivo* d'une cinétique de prolifération est nécessaire. Pour cela, d'autres approches basées sur l'incorporation de label administrable *in vivo* ont été développées. C'est le cas du BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridine), un analogue de la thymine (nucléotide qui compose l'ADN), qui est dilué si de l'ADN nouvellement généré est produit dans la cellule au moment de la division. Après une période de traitement permettant l'incorporation du BrdU, la quantification de sa perte est réalisée pendant une phase qui peut s'étaler sur plusieurs centaines de jours. Les résultats obtenus par cette méthode varient selon les études mais indiquent que la majorité de CSHs semble se diviser au moins une fois en 6 mois (Cheshier et al. 1999; Kiel et al. 2007). Le développement du modèle transgénique de souris H2B-GFP permet de préciser ces résultats. Il s'agit d'un modèle où les souris expriment des histones 2B modifiées, couplées à des protéines fluorescentes comme la GFP. Ce modèle indique que les CSHs peuvent être séparées en deux populations (Wilson et al. 2008). La première population (15% des CSHs) ne se divise en moyenne qu'une fois tous les 145 jours et est définie comme les CSHs dormantes (dCSHs). La seconde population (85% des CSHs) se divise plus régulièrement avec en moyenne une division tous les 36 jours et correspond aux CSHs activées (aCSHs).

Deux variantes du modèle H2B-GFP existent dans la littérature. Le premier est un modèle dit « Tet-off ». Dans celui-ci, un promoteur spécifique des CSHs induit l'expression d'une tétracycline régulable de transactivation (Tta), qui va ensuite activer un promoteur contrôlant l'expression de H2B-GFP. Un traitement à la doxycycline réprime l'expression de la protéine H2B-GFP par le couplage de la doxycycline avec les Tta, ce qui empêche l'interaction avec son promoteur (Figure 8). La perte de signal a donc lieu après une répression de l'expression de H2B-GFP (Tumbar et al. 2004). Cette perte s'explique par (1) le remplacement des histones 2B continuellement dégradées, (2) la génération de nouvelles histones 2B lors de la division cellulaire. En effet, en cas de division cellulaire la moitié des H2B-(GFP) est transmise dans les deux cellules filles.

Le second modèle H2B-GFP est dit « Tet-on ». Ici, le traitement à la doxycycline induit directement l'expression de l'histone couplée à la GFP, et ce dans l'ensemble des cellules de la souris. Après un temps d'induction de quelques semaines, qui permet de remplacer l'ensemble des H2B normaux par des H2B couplés à la GFP, la doxycycline est retirée (Figure 8). La perte du signal se fait donc avec l'arrêt de l'activation de l'expression des H2B-GFP et sera dû ici

aussi au remplacement des histones nouvellement synthétisés (par division ou dégradation). L'analyse de la dormance des CSHs avec le modèle « Tet-on » a permis d'obtenir des résultats similaires aux modèles « Tet-off », avec environ 20% des CSHs se divisant tous les 55 à 120 jours (Foudi et al. 2009). Ces deux approches connaissent toutes deux leurs limites (Table 1), et ont été source de mésinterprétations au cours des dernières années (Bernitz et al. 2016; Morcos et al. 2020). En effet, pour le modèle Tet-off, l'intégration de la cassette permettant l'expression de l'histone 2B est aléatoire, ce qui induit une variabilité du niveau d'expression. Pour le modèle Tet-on, il existe une hétérogénéité de la fuite d'expression de H2B-GFP en fonction du type cellulaire. De plus, la vitesse du processus continu de remplacement des histones a été sous-estimée. En effet, la limite la plus importante de ces modèles H2B-GFP pour l'étude de la dormance vient de la « faible » durée de vie des protéines H2B. Ceci implique pour l'étude de la dormance que la perte du signal résulte bien plus de la dégradation continue des H2B-GFP que de leur remplacement lors de la prolifération, ce qui rend la modélisation mathématique plus complexe (Figure 8).

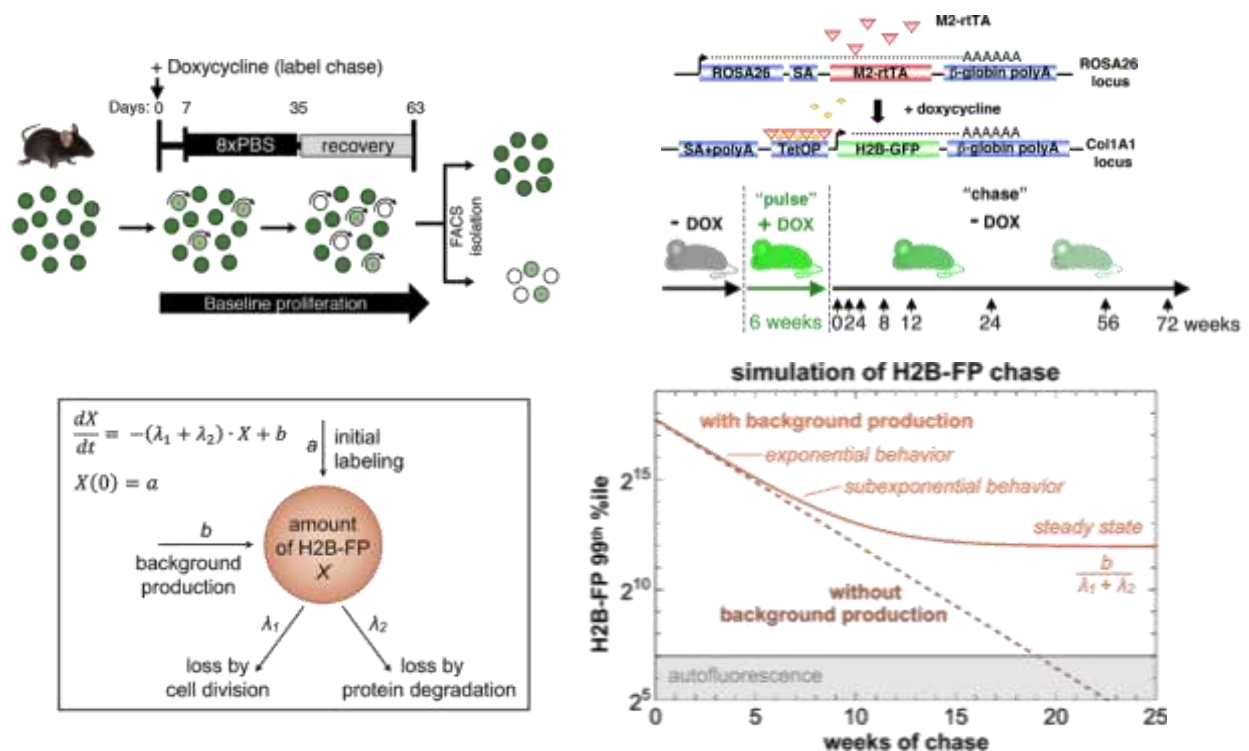


Figure 8 : Modèle expérimental permettant l'étude de la quiescence cellulaire de CSHs à l'aide d'un modèle H2B-GFP « Tet-off » (Panel haut gauche) ou « Tet-on » (Panel haut droit). Formule mathématique décrivant la perte de signal H2B-GFP dans le temps en prenant en considération les variables de production du « background », de division cellulaire et de dégradation protéique (Panel bas). (D'après Foudi et al. 2009 ; Morcos et al. 2020)

### 3) Méthodes alternatives

Comme discuter précédemment, les stratégies expérimentales permettant l'étude de la quiescence et/ou dormance cellulaire possèdent leurs limites et désavantages. Celles-ci se concrétisent par la nécessité de (1) fixer/perméabiliser les cellules pour le ki67 et le BrdU, de (2) sortir les cellules de leur micro-environnement dans le cas du CFSE, (3) d'une acquisition longue pour les approches de BrdU et H2B-GFP. C'est pourquoi d'autres alternatives moins invasives ont été mises en place avec par exemple le modèle « d'indicateur fluorescent du cycle cellulaire basé sur l'ubiquitinylation » (Fucci) (Sakaue-Sawano et al. 2008). Celui-ci se base sur l'expression constitutive des protéines du cycle cellulaire Geminin et Cdt1, fusionnées respectivement aux marqueurs fluorescents mVenus et mCherry (reportés tout deux comme ayant une faible demi-vie, n'impactant donc pas celle des protéines de fusion). La protéine Cdt1 débute son expression à partir de la mitose puis pendant toute la phase G1. Son expression protéique est ensuite réprimée à l'entrée de la phase S. La protéine Geminin est exprimée à partir de la phase S puis atteint son niveau le plus haut en G2 et n'est plus exprimée à partir de la mitose (Figure 9).

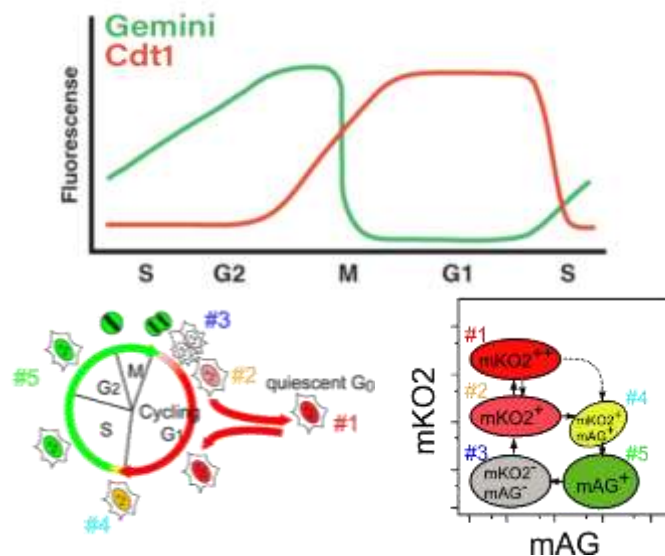


Figure 9 : Schéma de l'évolution de la fluorescence des marqueurs Gemini et Cdt1 du modèle Fucci en fonction des différentes phases du cycle cellulaire (Panel Haut). Représentation du cycle cellulaire associé à la stratégie de fenêtrage utilisé en cytométrie en flux afin de discriminer les populations (Panel bas). (D'après Tomura et al. 2013)

En utilisant un modèle murin transgénique exprimant le système Fucci, des chercheurs purent discriminer différentes phases du cycle cellulaire pour la lymphopoïèse B et T à l'état d'équilibre (Tomura et al. 2013). Cependant, le modèle conventionnel de Fucci n'est que peu adapté pour l'étude de la quiescence et de la dormance cellulaire. En effet, malgré qu'un haut

niveau d'expression de Cdt1 semble corrélérer à la quiescence cellulaire, il n'est pas spécifique de celle-ci. C'est pourquoi d'autres modèles ont été développés. Ils utilisent des marqueurs fluorescents couplés à d'autres protéines du cycle cellulaire, plus spécifique de l'entrée en phase G0. C'est le cas du modèle m-Venus-p27K qui peut identifier les cellules quiescentes du tissu musculaire (Oki et al. 2014).

Récemment, l'équipe de Jessberger a développé un nouveau modèle « iCOUNT » permettant de suivre une cinétique de division (Denoth-Lippuner et al. 2021). Il ne s'agit pas ici à proprement parler d'une approche de dilution de label. Ce modèle utilise des « recombinaisons induites par échangeur de tag » (RITE) qui permettent de réaliser des changements (Cre dépendant) d'une protéine fluorescente à une autre sous certaines conditions. Dans leur article, les auteurs utilisent des Histone 3.1-mCherry et -GFP qui ont l'avantage d'être beaucoup plus stables dans le temps que les histones 2B. L'ensemble des cellules exprime au départ des H3.1-mCherry et après un traitement au tamoxifène, chaque division entraîne la perte de la moitié de la dose de H3.1-mCherry et le gain d'une demi dose de H3.1-GFP (Figure 10). La combinaison d'une augmentation et d'une baisse de ces marqueurs augmente sensiblement la précision de l'analyse et permet de compter le nombre de divisions réalisées. Actuellement, le nombre de divisions discriminables n'est que de 4, mais peut être augmenté en utilisant une troisième couleur de switch (miCOUNT). L'approche iCOUNT n'a pour l'instant été utilisée que sur des temps relativement courts dans des contextes *in vitro* ou d'embryogenèse. Des études futures devront démontrer les avantages de son utilisation pour l'étude de la dormance des CSHs.

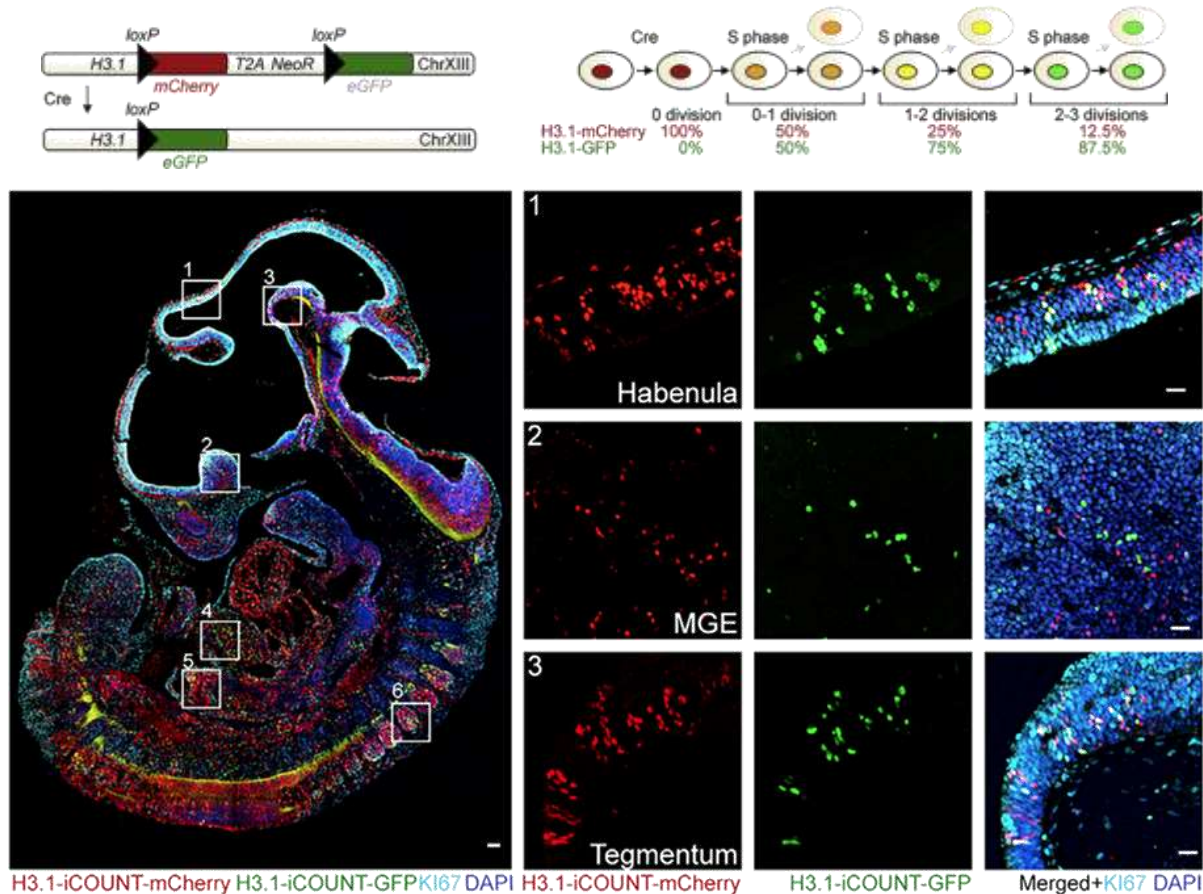


Figure 10 : Schéma de la construction génique du modèle iCOUNT (*Panel haut gauche*). Schéma des changements théoriques de fluorescence liées aux divisions cellulaires (*Panel haut droit*). Image d'immunofluorescence après traitement au tamoxifène de J9.5 à J11.5 d'un embryon de souris portant la construction iCOUNT (*Panel bas*). (D'après [Denoth-Lippuner et al. 2021](#))

Il est important de spécifier que les études de la dormance des CSHs s'accordent sur le fait qu'il existe des CSHs primitives qui possèdent une activité mitotique peu fréquente. Cette faible activité mitotique ne semble pas faire intervenir les CSHs dans le processus d'hématopoïèse à l'état d'équilibre, comme l'indique des expériences de cartographie de destin cellulaire ([Sun et al. 2014](#); [Busch et al. 2015](#)). De plus, des expériences de déplétions spécifiques des CSHs chez la souris corroborent l'hypothèse que les CSHs sont requises pour l'hématopoïèse en condition de stress et non pour l'hématopoïèse à l'état d'équilibre ([Schoedel et al. 2016](#); [Sheikh et al. 2016](#)).

## I.2.B – L'auto-renouvellement : ou comment préserver l'immaturité cellulaire

### I.2.B.a Définition

Malgré les mécanismes de dormance empêchant les CSHs d'entrer en cycle trop fréquemment, il est démontré qu'une CSH se divise entre 2 et 3 fois par an (Foudi et al. 2009; Morcos et al. 2020). Cette obligation à la division chez les CSHs ne s'est pas faite sans une certaine adaptation. L'auto-renouvellement est défini comme un mécanisme cellulaire couplant prolifération et maintenance de la multipotence des cellules souches. En effet, une cellule souche peut réaliser (1) une division symétrique, donnant deux cellules filles chez lesquelles sera dilué équitablement l'ensemble des composants cellulaires (ARN et protéines). Elle correspond à la division classique réalisée par la majorité des cellules. Les cellules souches (CSs) peuvent aussi réaliser une division dite asymétrique (2), qui est décrite comme leur étant plus spécifique. Cette division permet aux CSs de séparer asymétriquement le matériel non génétique, préservant ainsi efficacement les propriétés d'une des deux cellules filles et modifiant profondément les propriétés de la seconde (Figure 11). Ces deux types de division sont différenciellement appliquées en fonction des signaux perçus par la CSH et permettent de répondre efficacement au besoin de l'organisme en temps réel.

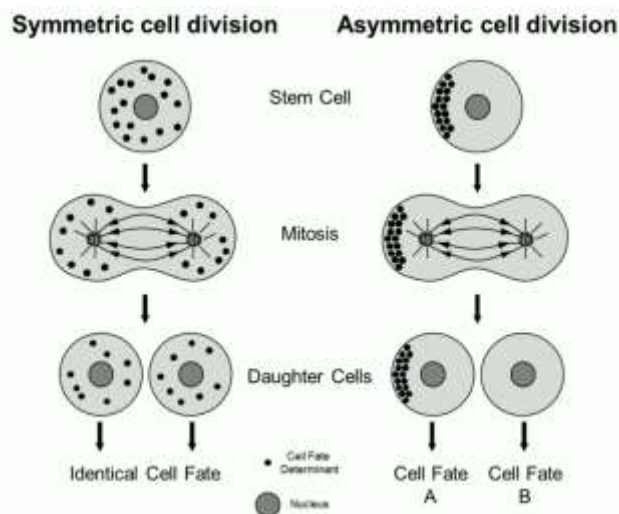


Figure 11 : Illustration schématique des mécanismes de division symétrique et asymétrique d'une cellule souche permettant la répartition des composants cellulaires. (D'après Murke et al. 2015)

### 1.2.B.b Séquestration asymétrique des composants d'immaturité chez les CSHs

Lors de la division cellulaire, le fuseau mitotique est constitué de deux pôles depuis lesquels sont projetés des microtubules. Ces microtubules sont répartis selon trois classes. Les premiers sont les microtubules du kinétochore qui se lient aux chromosomes afin de les séparer, les seconds sont les microtubules interpolaire permettant de maintenir éloignés les deux pôles. Enfin, les derniers sont appelés microtubules astraux et rayonnent autour de leur pôle respectif afin de séparer le matériel non génétique (Siller & Doe 2009). Pendant une division asymétrique, la cellule mère oriente ses fuseaux astraux afin de séparer asymétriquement les déterminants de destinée cellulaire. Pour cela, la cellule doit se polariser, c'est-à-dire s'attacher à son micro-environnement afin de concentrer une part importante de sa machinerie moléculaire à un pôle spécifique. La concentration asymétrique du matériel cytoplasmique est permise par l'action des complexes multiprotéiques PAR, Crumbs et Scribble (Martin et al. 2021). Ces complexes protéiques forment un ancrage au niveau de la membrane plasmique suivant l'axe défini par l'interaction avec leur micro-environnement (Figure 12). Ils interagissent également avec les fuseaux astraux ainsi que le cytosquelette d'actine de la cellule afin de favoriser l'action de systèmes de transport actif de dynéine qui vont acheminer des protéines comme des facteurs de transcriptions.

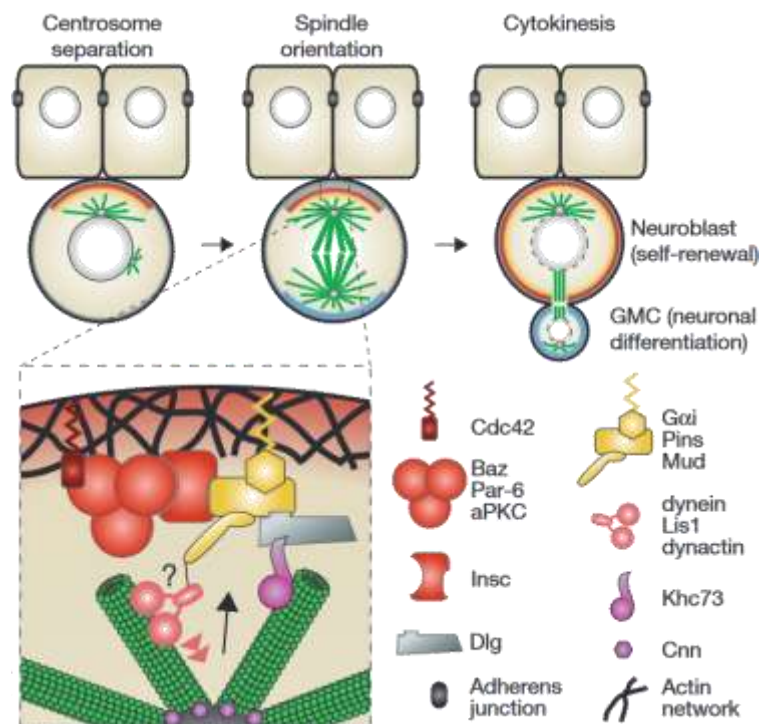


Figure 12 : Illustration schématique de l'ancrage protéique des complexes d'asymétrie après adhésion d'une cellule avec son micro-environnement. (D'après Siller & Doe 2009)



L'étude de ce mécanisme dans la CSH démontre que la RhoGTPase Cdc42 possède un rôle crucial dans la répartition asymétrique du matériel non génétique. Cdc42 est décrit comme permettant l'ancrage à la membrane plasmique du complexe PAR et Scribble. Cependant, seul le complexe Scribble est démontré comme impliqué dans les divisions asymétriques des CSHs. Le modèle murin KO inductible pour *Cdc42* montre que les CSHs perdent leur capacité à réaliser des divisions asymétriques. En absence de division asymétrique, les CSHs perdent leur capacité d'auto-renouvellement et de quiescence cellulaire, soulignant l'intrication de ces deux mécanismes (Yang et al. 2007). De plus, les auteurs reportent une importante proportion de CSHs dans le sang suggérant que ces défauts fonctionnels sont associés à des défauts d'interactions avec la niche hématopoïétique. L'action en aval de Cdc42 dans la répartition asymétrique des déterminants de destinée cellulaire est dépendante des protéines Borg4 et Septin7 (Kandi et al. 2021). Les septines sont des protéines ciblées par les GTPases qui forment des filaments stables se complexant avec les microtubules et les filaments d'actines afin de les orienter dans le cytoplasme. Cette orientation du cytosquelette permet à des protéines de transport telle que Lys1 de répartir asymétriquement des composants non génétiques chez les CSHs (Zimdahl et al. 2014).

L'activation de la voie de signalisation Hippo est nécessaire pour l'action de Scribble et de Cdc42 dans les CSHs. Cette voie de signalisation est régulée principalement par la densité de contact cellule-cellule, où une haute densité va permettre de phosphoryler les coactivateurs transcriptionnels YAP1 et TAZ afin de les relarguer dans le cytoplasme (Zhao et al. 2007). Dans les CSHs, Scribble coordonne l'organisation et l'activation de la voie de signalisation Hippo. En effet, Scribble se colocalise dans le cytosol avec YAP1 et TAZ phosphorylés, ce qui permet le recrutement de Cdc42. Ces résultats sont corroborés par la perte d'asymétrie et de quiescence des CSHs en absence de YAP, TAZ et Scribble (Althoff et al. 2020). Plus récemment encore, il est démontré que la dose de YAP1 *in vivo* est bien plus faible que celle de TAZ dans les CSHs, soulignant l'importance physiologique de ce dernier (Kim et al. 2022).

Les protéines NUMB ont été identifiées dans les divisions asymétriques des cellules d'embryons de drosophiles. Bien que le mécanisme exact ne soit pas encore compris, la répartition asymétrique des protéines NUMB a été liée à la spécification d'un destin cellulaire (Knoblich et al. 1995). La démonstration de leur répartition asymétrique chez la CSH, et son impact sur le devenir cellulaire a été récemment prouvée par l'équipe de Timm Schroeder. Pour cela, les auteurs utilisent dans leurs études une approche de vidéo-microscopie capable de traquer le devenir de chaque cellule en temps réel (Figure 13), chez la souris (Loeffler et al.

2019) et chez l'Homme (Loeffler et al. 2022). Par cette approche, ils ont identifié de nombreuses protéines et composants cellulaires différemment répartis lors de la division asymétrique des CSHs. Leurs résultats indiquent que les lysosomes, les autophagosomes, les mitophagosomes ainsi que des protéines telles que TOM20, Cd63 et Notch1 sont asymétriquement distribués dans la cellule fille la plus souche. Cet héritage moléculaire permet de prédire le devenir des cellules filles dans la différenciation ainsi que leur future activité métabolique. Les résultats révèlent que la cellule fille avec l'héritage non génétique le plus faible (et le moins souche) s'engage dans la différenciation. Néanmoins aucune détermination de lignage n'est observée à ce stade et les auteurs suggèrent que celle-ci pourrait être uniquement dû à l'interaction des cellules filles avec leur micro-environnement proche (facteurs extrinsèques). Il existe aussi des cas opposés, où la répartition protéique va s'orienter vers la cellule fille destinée à se différencier. C'est notamment le cas des protéines CD71 et du facteur de transcription Myc.

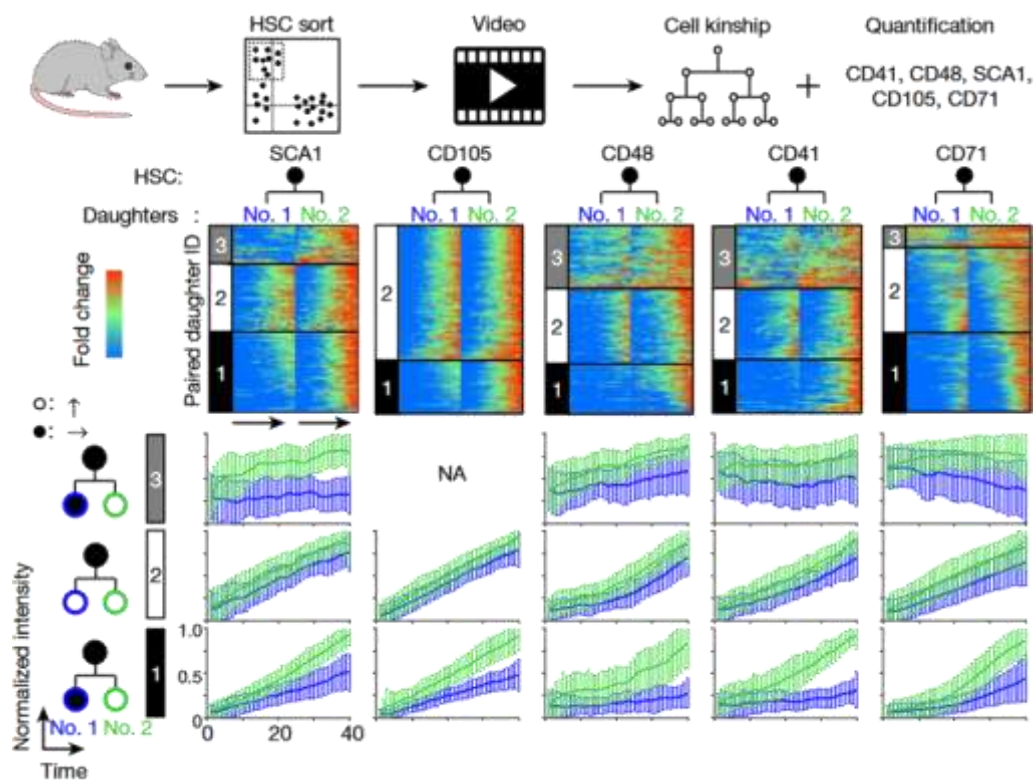


Figure 13 : Classification du type de division par l'observation continue de la répartition des déterminants cellulaires. Schéma expérimental (*Panel Haut*). Représentation en heatmap de la dynamique de fluorescence dans le temps après division d'une CSH. Chaque ligne correspond à la répartition d'un marqueur entre deux cellules filles provenant de la même CSH (*Panel central*). Représentation moyennée de l'ensemble des cellules suivies pour chaque marqueur et par type de division (*Panel bas*). (D'après Loeffler et al. 2019)

### 1.2.B.c Dépendance du micro-environnement pour la polarisation cellulaire

Comme nous l'avons abordé précédemment, la polarisation cellulaire d'une cellule est dépendante de son interaction avec le micro-environnement. Ce mécanisme est bien décrit lors de l'embryogenèse et a été plus récemment incriminé dans l'hématopoïèse adulte (Wu et al. 2007). Il est notamment décrit pour certaines cellules matures, telles que les lymphocytes B lors de la réponse à la présentation d'un antigène par une cellule dendritique (Thaunat et al. 2012), mais aussi pour les CSHs (Figure 14).

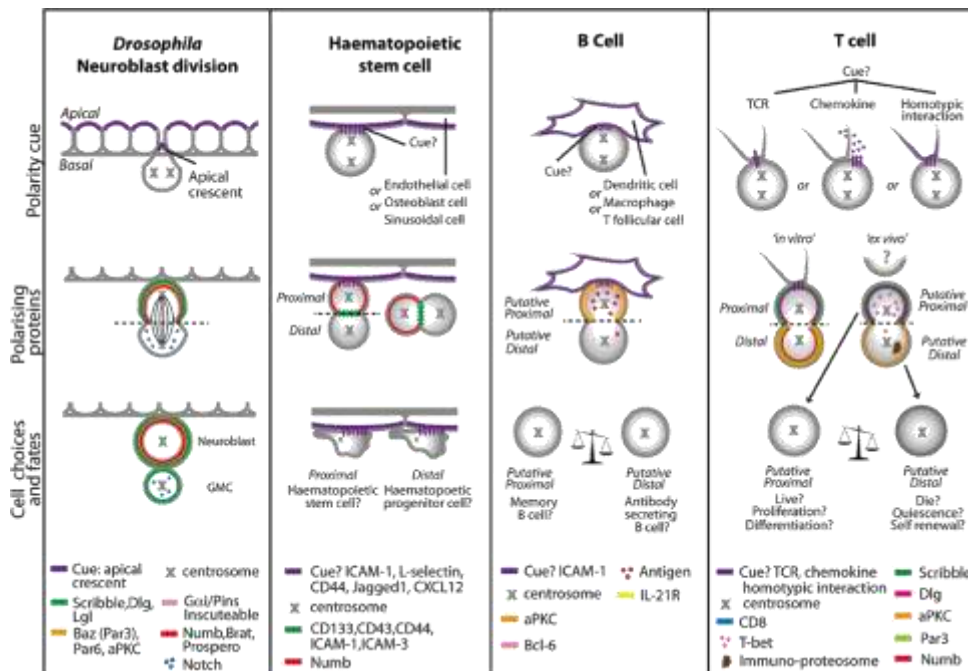


Figure 14 : Illustration schématique de différents cas de polarisation cellulaire associée à une asymétrie de répartition de matériel non-génétique. (D'après Pham et al. 2014)

L'identité de la cellule du micro-environnement permettant la polarisation des CSHs reste à définir. Cependant, des travaux récents ont mis en évidence l'implication d'interactions ligands-récepteurs. Il s'agit d'interactions impliquant le récepteur kit et son ligand le « Stem cell factor » (Scf,) ainsi que le ligand VCAM1 et son récepteur VLA4 (CD49d + Cd29) (Hao et al. 2021). D'une part l'interaction entre VLA4 et VCAM-1 permet à la CSH d'adhérer à son substrat afin de maximiser sa surface d'interaction, d'autre part l'interaction entre le SCF membranaire et Kit va permettre à la CSH de former des protrusions hautement concentrées en récepteurs-ligands. La combinaison des deux interactions permet à la CSH de se polariser sur un axe proximal/distal en concentrant son cytosquelette d'actine dans une zone distincte du cytoplasme (Figure 15).

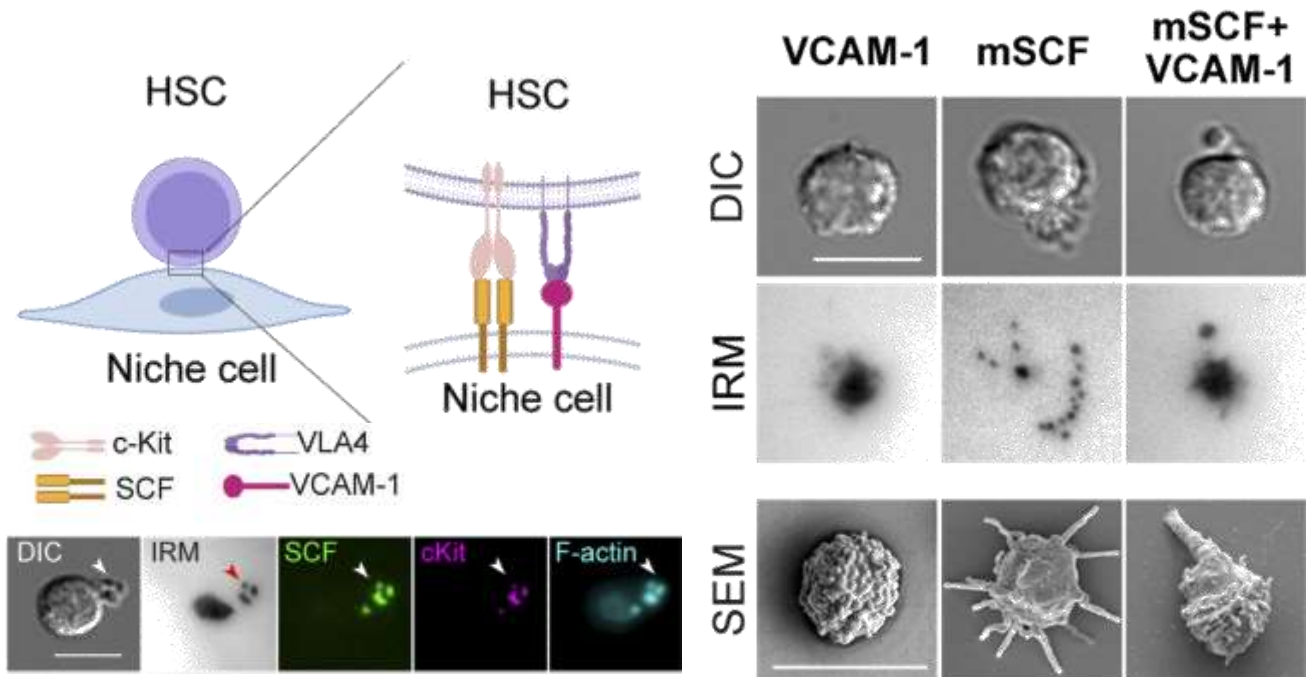


Figure 15 : Représentation schématique de l'interaction entre une CSH et une cellule du micro-environnement (*Panel haut gauche*). Interactions de CSHs visualisées par différentes technologies de microscopie mettant en évidence les modifications morphologiques en présence de VCAM-1, de Scf membranaire et de la combinaison des deux (*Panel de droite*). Résultat par immunofluorescence de la concentration de kit associé au cytosquelette d'actine après interaction d'une CSH et de son micro-environnement (*Panel bas gauche*). SEM : Microscope Electronique à Balayage / IRM : Microscope à Réflexion d'Interférence / DIC : Contraste d'Interférence Différentielle. (D'après [Hao et al. 2021](#)).

D'autres résultats soulignent l'importance du marqueur kit pour les CSHs. En effet, des résultats *in vivo* ont montré que son expression dans les CSHs était nécessaire pour leur nichage hématopoïétique. De plus, son absence est associée à une perte progressive des CSHs dans la moelle osseuse ([Thorén et al. 2008](#)). Il est aussi rapporté que la signalisation kit induite dans les CSHs est différente selon que le Scf soit soluble, avec une action pro-proliférative ([Zhang & Lodish 2008](#)) ou membranaire pour leur maintenance à long terme ([Barker 1994](#)). Cette dichotomie est actuellement assez mal comprise mais souligne l'importance du micro-environnement pour déterminer le programme moléculaire et la fonction d'une cellule. Des études similaires utilisant des HSPCs humaines prouvent qu'elles sont capables de se polariser à l'aide d'interaction avec leur micro-environnement ([Wagner et al. 2004](#); [Wagner et al. 2005](#)), ce qui suggère fortement que ce mécanisme est préservé chez les mammifères.

### 1.2.B.d Quantification d'un potentiel d'auto-renouvellement : expérience de transplantation

Comme expliqué précédemment, l'auto-renouvellement se définit par la capacité d'une cellule à maintenir son identité à long terme, malgré des divisions successives. Le test hématopoïétique de référence utilisé afin d'estimer une capacité d'auto-renouvellement est l'expérience dite de « repopulation » après transplantation. En effet, l'auto-renouvellement des CSHs est évaluée par leur aptitude à générer et maintenir un tissu hématopoïétique à long terme après transplantations successives dans des animaux receveurs (Figure 16). Un temps suffisamment long est nécessaire pour visualiser l'implication des CSHs car certains progéniteurs sont capables de maintenir leur activité de repopulation à court terme. Les expériences de transplantation en dilution limite (LDA) ont été développées afin de calculer une fréquence de cellules capables de greffer au sein d'une population hétérogène transplantée (Figure 16). Elles consistent en la transplantation de différentes doses cellulaires d'une population donnée pour connaître le nombre de cellule nécessaire à la prise de greffe.

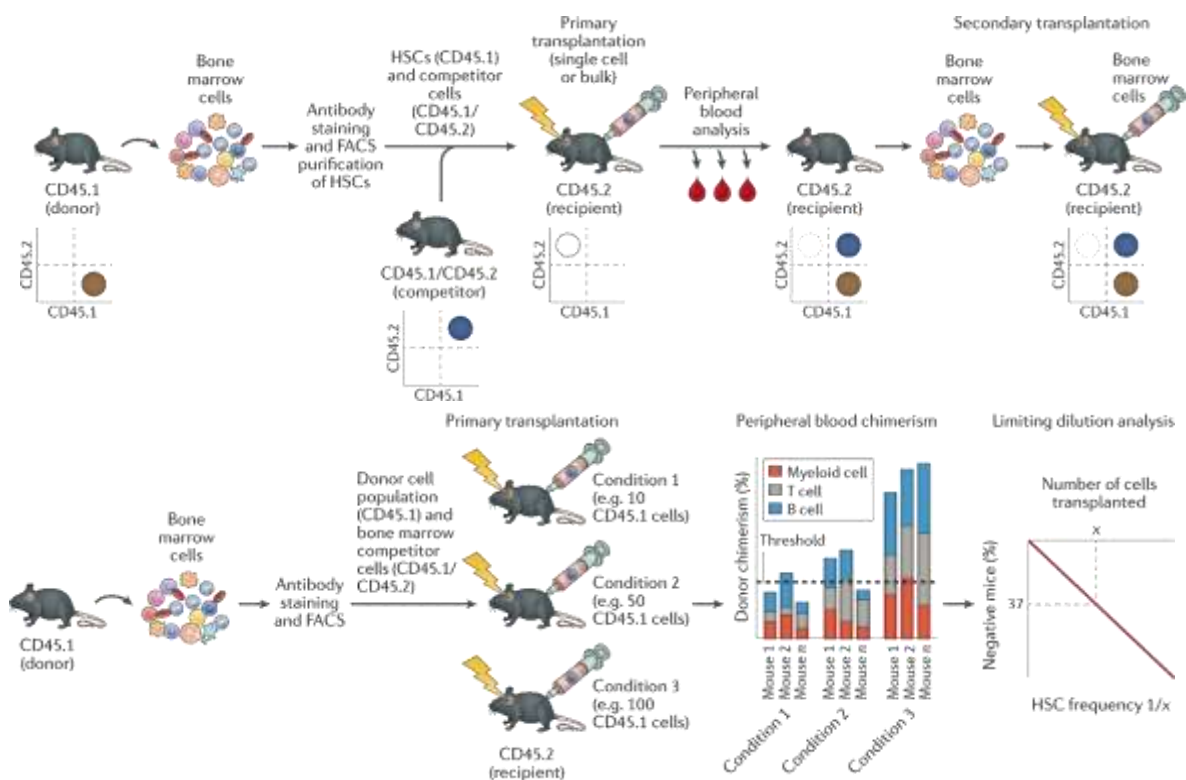


Figure 16 : Représentation schématique des différentes stratégies expérimentales de transplantation. Le test standard de transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez la souris utilise le système syngénique CD45.1/CD45.2. Les cellules de moelle osseuse sont prélevées sur une souris donneuse portant l'allèle CD45.1, à partir de laquelle les CSHs sont isolées par tri cellulaire en FACS. Les CSHs sont mélangées avec des cellules de moelle osseuse de support provenant de souris CD45.1 et transplantées dans une souris receveuse portant l'allèle CD45.2. Une étape de conditionnement est réalisée juste avant la

transplantation. Cette étape permet de libérer des niches hématopoïétiques dans la moelle osseuse pour que les cellules greffées puissent se nicher correctement. Celle-ci peut être faite par irradiation ou bien par l'action de composé myéloablatif tel que du Busulfan. Le suivi de la prise de greffe est fait par cytométrie en flux sur une période longue (24 semaines pour les CSHs) par prélèvement sanguin ou de la moelle osseuse (*Panel du haut*). L'expérience de dilution limite permet de déterminer la fréquence de CSHs au sein d'un échantillon par la transplantation de différentes doses (nombre) de cellules chez des souris receveuses. La prise de greffe est déterminée par cytométrie à partir de prélèvement sanguin ou de moelle osseuse si un certain seuil de chimérisme est dépassé (fixé à 0,1-1%). Le calcul de la fréquence se base sur une loi de poisson où le nombre de cellules greffées correspondant à 37% de souris négative est égal à 1/fréquence des CSHs (*Panel du bas*). (D'après [Wilkinson et al. 2020](#))

Chez la souris, les LT-CSHs et ST-CSHs sont les cellules capables de se maintenir à plus long terme, indéfiniment et jusqu'à 6 mois, respectivement. Comparativement, les différentes fractions de MPP perdent progressivement cette capacité et s'épuisent après transplantation au bout de quelques mois ([Kiel et al. 2005](#); [Cabezas-Wallscheid et al. 2014](#)). Le phénotype discriminant les LT-CSHs (LSK Cd135<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>) chez la souris approche la fréquence de 1 cellule sur 1 capable de régénérer un tissu hématopoïétique sur le long terme.

Chez l'Homme, les marqueurs phénotypiques utilisés afin de séparer les progéniteurs les plus précoces des CSHs sont distincts de ceux utilisés chez la souris. La mise en évidence des CSHs humaines fut initialement réalisée à partir d'expérience *in vitro* de culture à long terme (plus de 6 semaines). Ces expériences démontraient que l'absence de marqueur de lignage, du CD38 et la présence des marqueurs CD34 et CD90 permettaient un enrichissement en CSHs ([Baum et al. 1992](#); [Craig et al. 1993](#)). La mise en place des modèles de souris immunodéficientes (SCID puis NOD-SCID) a ensuite permis de confirmer ces résultats malgré un enrichissement en CSHs humaines relativement faible comparativement aux CSHs isolées chez la souris ([Hogan et al. 2002](#); [Shultz et al. 2005](#)). Les approches de LDA dans des souris immunodéficientes ont permis de préciser le phénotype des CSHs humaines, tout d'abord Lin<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> pour une fréquence d'environ 1/10 ([Majeti et al. 2007](#)) puis de 1/4 en rajoutant le marqueur CD49f<sup>+</sup> ([Notta et al. 2011](#)).

#### *1.2.B.e Expansion et préservation fonctionnelle des CSHs ex vivo*

Les patients atteints d'hémopathies malignes sont dans certains cas, éligibles à une allogreffe de CSHs après des cycles de chimiothérapie. L'effet attendu est un mécanisme bénéfique de greffon contre la leucémie (GVL) ([Bleakley & Riddell 2004](#)). Deux types de sources de greffons existent : les CSHs issues de cellules CD34<sup>+</sup> mobilisées dans le sang

périphérique ou de cellules CD34+ issues de sangs de cordons. La disponibilité des greffons reste insuffisante pour l'ensemble des patients du fait qu'il est essentiel d'avoir un donneur compatible pour éviter les rejets de greffe. Il est donc nécessaire de trouver des alternatives pour produire des CSHs compétentes en nombre suffisant. La culture cellulaire *ex-vivo* des CSHs humaines induit une forte baisse de fonctionnalité caractérisée par une perte d'activité d'auto-renouvellement. Afin de dépasser ces limites, l'équipe de Guy Sauvageau a réalisé un crible chimique pour identifier des composés chimiques capables d'expandre les CSHs tout en préservant leur fonction d'auto-renouvellement. Cette approche a permis l'identification du composé UM171 (Fares et al. 2014) pouvant induire la prolifération *ex vivo* de CSHs humaines fonctionnelles. Le mécanisme d'action de ce composé a récemment été identifié (Chagraoui et al. 2021) par l'utilisation d'un crible CRISPR-Cas9.

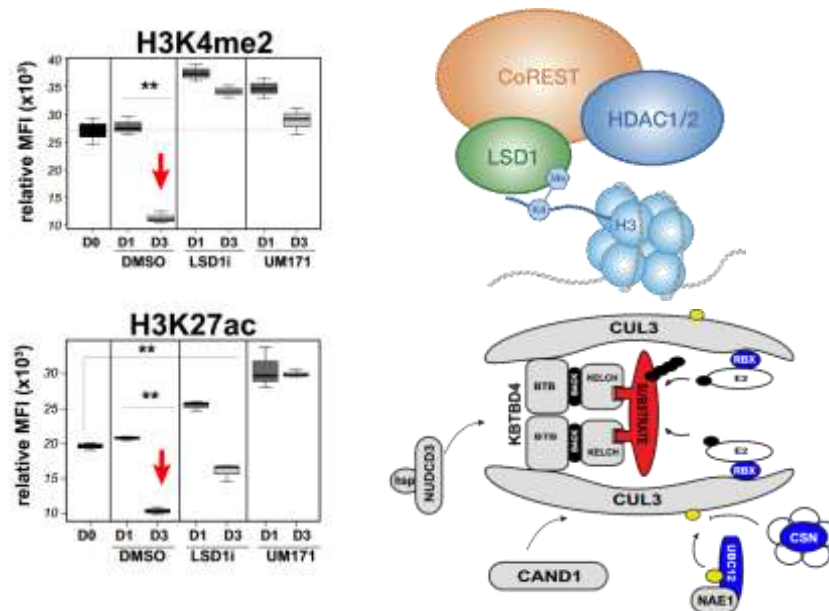


Figure 17 : Résultats décrivant l'évolution du niveau de méthylation après mise en culture de CSHs humaine. Quantification réalisée à l'aide d'anticorps couplé visualisé en cytométrie en flux (*Panel de gauche*). D0 : jour 0 ; D1 : jour 1 ; D3 : jour 3 ; MFI : moyenne d'intensité de fluorescence. Schéma décrivant l'action pro-méthylation permise par le complexe coREST (*Panel de droite*). (D'après Subramaniam et al. 2020 ; Chagraoui et al. 2021)

L'UM171 cible en effet spécifiquement le complexe CoREST ainsi que certains de ses partenaires tels que LSD1 (Subramaniam et al. 2020) pour induire leur dégradation. CoREST jouent un rôle crucial dans la déméthylation et désacétylation des histones. La mise en culture *ex-vivo* de CSHs est décrite comme étant associé à une baisse du niveau de méthylation et d'acétylation des histones. L'UM171 permet donc de maintenir de façon globale les marques épigénétiques importantes pour l'identité moléculaire d'immaturité des CSHs (Figure 17). Le mécanisme d'action de l'UM171 implique le recrutement de l'ubiquitine ligase CUL3 qui cible spécifiquement les protéines marquées par le complexe KBTBD4. Ce dernier adresse au

protéasome les complexes de régulation des marques épigénétiques tel que le complexe CoREST (Chagraoui et al. 2021).

Les cribles chimiques tel que celui ayant découvert l'UM171 permettent de répondre à une question biologique sans avoir à connaître le mécanisme d'action des molécules utilisées. A l'opposé, d'autres équipes ont d'abord étudié un mécanisme moléculaire clé pour la fonction des CSHs, puis se sont intéressés à de potentielles applications cliniques. Notamment, l'équipe de John Dick s'est intéressée aux voies de réponse au stress telle que la voie « *unfolded protein response* » (UPR) dans la régulation de l'auto-renouvellement des CSHs (van Galen et al. 2014). En effet, en condition de culture, il est reporté que les CSHs augmentent fortement leur synthèse protéique et que cette activité est liée à leur perte de fonctionnalité. L'activation de la voie de l'UPR dans les CSHs permet d'empêcher ce phénomène. Leurs travaux révèlent que la molécule 4HPR est capable de préserver le stress induit par l'UPR dans les CSHs, par une modulation du métabolisme des sphingolipides (Xie et al. 2019). Une autre équipe démontra que l'utilisation de la Tanespimycin (17-AAG), un inhibiteur connu de la protéine chaperonne HSP90, préserve l'activité d'auto-renouvellement des CSHs lors d'un passage en culture (Kruta et al. 2021). Les auteurs expliquent ce résultat par l'inhibition de l'interaction entre HSP90 et le facteur de transcription HSF1. En condition de culture, HSF1 est séquestré dans le cytoplasme des CSHs, empêchant ainsi son activité transcriptionnelle impliquée dans l'inhibition de la traduction.

Une autre limite inhérente à la transplantation de CSHs est la reconstitution hétérogène des différents lignages sanguins qui demeure une cause de morbidité et de mortalité (Seggewiss & Einsele 2010; Pineault & Boyer 2011). Des études font l'hypothèse que les biais de lignages s'expliquent par des défauts de plasticité des CSHs corrélé ou non avec des différences d'activités d'auto-renouvellement. Ces notions amènent l'hypothèse d'un potentiel découplage des propriétés d'auto-renouvellement et de multipotence. Pour mieux comprendre et étayer ces notions, nous allons nous intéresser dans le prochain chapitre aux relations qu'il existe entre le potentiel de différenciation et les propriétés souches d'une cellule.

### *1.2.C – Potentiel de différenciation :*

Le potentiel de différenciation d'une cellule correspond à sa capacité à générer différents types de cellules matures en fonction des signaux perçus. Ce potentiel est directement en lien avec la capacité de la cellule à mettre en place des programmes transcriptionnels différents. Le devenir d'une cellule dépendra de l'action de facteurs de transcription ainsi que



de l'environnement signalétique de la cellule au moment de l'expression de ces facteurs (interaction cellules-cellules ou/et cellules-matrice extra cellulaire ; cytokines ou/et chimiokines). Une CSH, de par l'ensemble de ces interactions, est considérée comme capable d'initier n'importe quel type de cellules hématopoïétiques matures : myéloïde, lymphoïde B, lymphoïde T, érythroïde et plaquettaire. C'est pourquoi l'on considère que les CSHs sont des cellules possédant un haut niveau de plasticité cellulaire. Cependant, jusqu'à récemment, aucun consensus scientifique n'existait pour savoir si les CSHs pouvaient être intrinsèquement amorcées ou non vers un lignage hématopoïétique. Je discuterai ici de l'état actuel des connaissances sur : l'hétérogénéité de plasticité des CSHs, le mécanisme physiologique de perte de plasticité liée à l'âge, et le gain de plasticité (appelé reprogrammation) induit expérimentalement.

### *1.2.C.a Hétérogénéité de la plasticité cellulaire chez les CSHs*

Afin de comprendre et d'identifier l'hétérogénéité de plasticité cellulaire des CSHs, des approches de transplantation en cellule unique ont été utilisées. L'équipe de Jacobson démontra par ces approches que les CSHs étaient graduellement restreintes vers la génération exclusive du lignage mégacaryocytaire (Sanjuan-Pla et al. 2013). A ce jour, il s'agit de la seule restriction complète de lignage décrite pour une CSH. Ce résultat est corroboré par la transplantation de CSH individuelle dans plus de 1000 souris (Carrelha et al. 2018). Les auteurs ont discriminé des CSHs capables de générer l'ensemble des lignages, de celles capables de générer l'ensemble des lignages hormis les lymphocytes T, B, myéloïde puis érythroïde et enfin celle au potentiel mégacaryocytaire uniquement (Figure 18). L'équipe a utilisé un reporteur de l'expression de la glycoprotéine Vwf comme marqueur de cette restriction. Cette glycoprotéine est appelée le facteur de Von Willebrand, elle participe aux mécanismes d'hémostase, notamment pour l'adhésion des plaquettes et peut être exprimée dès le stade de CSH.

De plus, le maintien du biais de lignage et de la transplantabilité en série des CSHs VWF-Tomato<sup>high</sup> (restreintes pour le lignage plaquettaire) suggèrent fortement que cette perte de plasticité est intrinsèquement programmée par des mécanismes épigénétiques. Ces CSHs semblent capables de répondre uniquement à des stimuli provenant des mégacaryocytes (Pinho et al. 2018). En effet, les CSHs VWF<sup>+</sup> sont dépendantes des niches mégacaryocytaires comparativement aux CSHs VWF<sup>-</sup> (capable de générer le lignage lymphoïde), plus associées aux niches artériolaires (Figure 18). Des approches similaires chez l'Homme ont aussi permis de spécifier des différences de plasticité chez les CSHs. En effet, la perte de potentiel de différenciation myélo-érythroïde est corrélée à un gradient de gain de CD34 et de perte de CLEC9A à la surface des cellules (Belluschi et al. 2018). Mis ensemble, ces études corroborent

bien l'idée d'un découplage entre plasticité cellulaire, et activité d'auto-renouvellement à long terme.

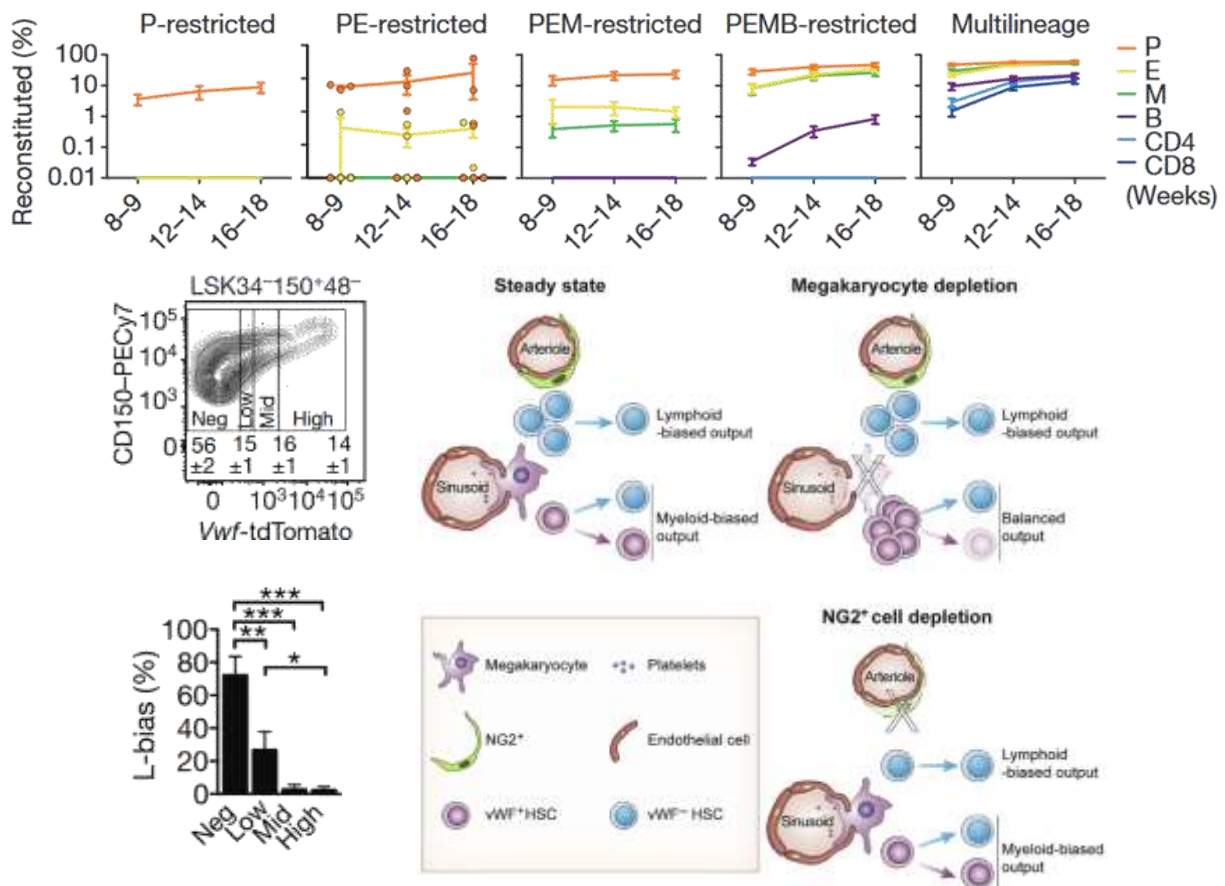


Figure 18 : Résultats concernant la caractérisation de l'hétérogénéité de plasticité cellulaires des CSHs obtenu à partir d'expérience de transplantation unicellulaire (*Panel haut*). Stratégie de fenêtrage des LT-CSHs en fonction du reporteur Vwf et résultats de leur transplantation pour générer des cellules lymphoïdes (*Panel bas gauche*). Schéma décrivant les interactions des CSHs et de leur micro-environnement expliquant les biais de lignages (*Panel bas droit*) (D'après Carrelha et al. 2018 et Pinho et al. 2018).

### 1.2.C.b Biais de lignage

L'exemple le plus connu d'un système dans lequel le potentiel de différenciation d'une cellule souche est impacté est le vieillissement. En effet, il fut tout d'abord constaté qu'avec l'âge, la composition et la fonctionnalité des cellules hématopoïétiques matures étaient impactées (Berkahn & Keating 2004). De plus, de nombreuses études révèlent que les fréquences des CSHs (de Haan & Van Zant 1999), des progéniteurs lymphocytaires commis (Miller & Allman 2003; Min et al. 2006) et des progéniteurs myéloïdes commis (Rossi et al. 2005) de la moelle osseuse sont altérées avec l'âge. Ces modifications se répercutent jusqu'au différentes populations de progéniteurs précoces des LSKs. En effet, le nombre de MPP3 et

MPP2 augmente ; tandis que celui des MPP4 diminue. Enfin, la proportion des LT-CSHs augmente de façon spectaculaire avec l'âge, de +/-12% à +/-60% (Sudo et al. 2000; Kuribayashi et al. 2020). Cette accumulation est associée à l'expression aberrante d'un haut niveau de Slamf1, de CD41 et de CD61 (Gekas & Graf 2013; Mann et al. 2018). La transplantation de LT-CSHs triées pour un niveau d'expression élevé de Slamf1 démontre que celles-ci sont fortement biaisées pour la différenciation myéloïde (Beerman et al. 2010), suggérant que la plasticité même des CSHs est impactée.

Cette perte de plasticité des LT-CSHs âgées semblent incriminer des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les facteurs intrinsèques se traduisent par de nombreux défauts telles que la perte de la capacité des cellules à se polariser (Florian et al. 2018), l'accumulation de dommage à l'ADN (Mohrin et al. 2010), la modification de leur réseau de régulation transcriptionnel (Desterke et al. 2021; Héroult et al. 2021) ainsi qu'une altération globale du niveau de méthylation de l'épigénome (Adelman et al. 2019).

L'étude de la niche hématopoïétique lors du processus de vieillissement a aussi démontré qu'elle possédait un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie hématopoïétique. En effet, l'équipe de J. Trowbridge démontra qu'il est possible de réduire drastiquement les biais liés à l'âge grâce à une unique cytokine : Igf1 (Young et al. 2021). Afin d'identifier cette cytokine, ils constatèrent tout d'abord que la transplantation de LT-CSHs dans des souris jeunes réduisait considérablement le biais de différenciation myéloïde. Ils utilisèrent ensuite une approche Sc-RNAseq comprenant des LT-CSHs jeunes et âgées, couplée à leurs cellules du micro-environnement respectives, afin d'identifier le couple récepteur-ligand le plus à même d'expliquer les différences liées à l'âge (Figure 19). De plus, les approches récentes de parabiose chez la souris corroborent ces résultats. Elles indiquent que les défauts liés à l'âge pourraient être en grande partie compensés par des facteurs solubles et des interactions cellulaires (Ma, Wang, et al. 2022). L'étude précise du micro-environnement de la moelle osseuse indique que les LT-CSHs âgées ne se localisent pas dans les mêmes niches hématopoïétiques que les LT-CSHs jeunes (Figure 19). En effet, elles se nichent à distance de l'endosteum ainsi que des artérioles et s'agglutinent en cluster de cellules Slamf1 positives (Saçma et al. 2019). Mis ensemble, ces résultats soulignent l'interdépendance des mécanismes intrinsèques et extrinsèques dans la régulation de la plasticité des CSHs.

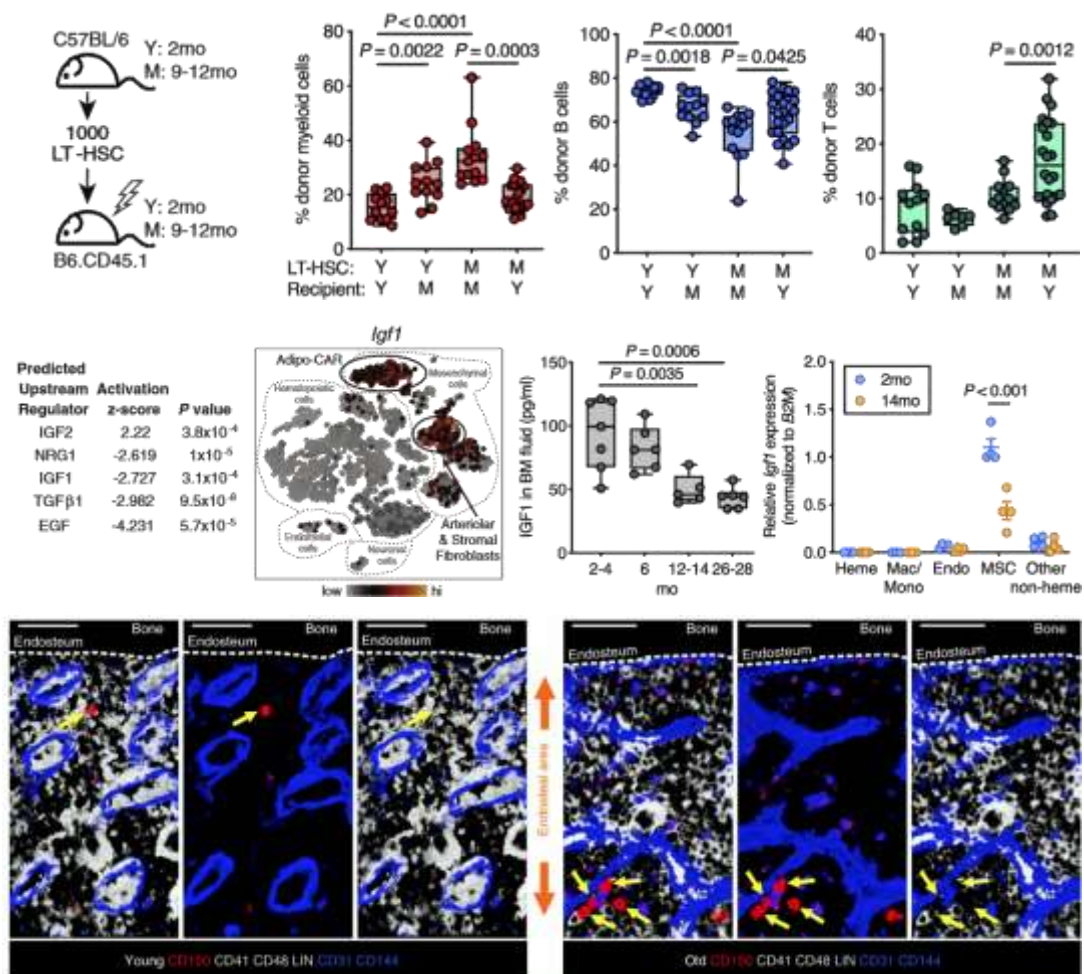


Figure 19 : Résultats étayant l'implication de la niche hématopoïétique dans la régulation de la plasticité des LT-HSCs dans le contexte des défauts de différenciation liée à l'âge (d'après [Young et al. 2021](#)). Expérience de transplantation de LT-HSCs suivant l'ensemble des combinaisons possibles entre des souris jeunes et des souris âgées (*Panel haut*). Incrimination d'IGF1 au niveau moléculaire dans la régulation des voies moléculaires liées au vieillissement ; ainsi qu'à la validation de sa raréfaction dans la moelle avec l'âge (panel central). Coupe de microscopie à fluorescence analysant la localisation des HSCs suivant l'âge des souris (*Panel bas*) (D'après [Saçma et al. 2019](#)).

Néanmoins, ces articles ne permettent pas de comprendre comment un réseau de régulation transcriptionnel peut être impliqué dans la plasticité des CSHs. De plus, s'il est possible de visualiser des processus de perte de plasticité, quand est-il du mécanisme opposé ? Pour répondre à cette question j'aborderai dans la prochaine partie les notions concernant les processus de reprogrammation.

### *1.2.C.c Plasticité cellulaire et reprogrammation :*

#### **1) Plasticité des CSHs pour d'autres lignages tissulaires**

Comme nous l'avons vu précédemment, la plasticité d'une cellule souche lui donne le potentiel de produire différents types de cellules matures. Le cas le plus emblématique concerne les cellules souches embryonnaires qui sont capables de générer l'ensemble des types cellulaires composant un organisme adulte : c'est ce que l'on définit comme la totipotence. En revanche, les cellules souches adultes deviennent plus restreintes dans leur potentiel de différenciation, ne pouvant engendrer les cellules que d'un seul tissu, c'est la multipotence. Ces notions furent challengées par le constat de la capacité de certaines cellules souches adultes à générer des cellules d'autres tissus dans des conditions particulières de stress. C'est le cas des CSHs qui ne participent qu'à la génération du tissu hématopoïétique en condition d'équilibre mais qui sont rapportées comme capables de se transdifférencier dans certaines situations. En effet, la transplantation de CSHs en condition de stress hépatique a démontré qu'elles pouvaient générer des cellules du lignage hépatique *in vivo* (Lagasse et al. 2000). De nombreuses autres approches furent employées à cette époque afin d'utiliser les CSHs, qui sont les cellules souches les plus facilement accessibles, comme matériel de base afin de générer d'autres tissus fonctionnels. Cela aboutit à la publication d'articles indiquant que malgré une certaine plasticité, et notamment l'expression de marqueur d'autres lignages, les CSHs n'étaient pas capables de concevoir des cellules neuronales (Roybon et al. 2006) ni des cardiomyocytes (Murry et al. 2004) fonctionnels. Ces limites de capacité de transdifférenciation inhérente à l'utilisation de cellules souche adultes furent dépassées avec la découverte des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs).

#### **2) Reprogrammation induite par les facteurs de Yamanaka**

L'équipe de Shinya Yamanaka démontra que l'expression ectopique des quatre facteurs de transcription Oct4, Sox2, c-Myc et Klf4 au sein de fibroblastes différenciés induit leur dédifférenciation et leur confère une plasticité proche des cellules souches embryonnaires (Takahashi & Yamanaka 2006). Cette découverte amena au développement de tout un nouveau champ d'expertise et d'application (Figure 20) encore activement étudié de nos jours. Au niveau moléculaire, la reprogrammation permise par les facteurs de Yamanaka se traduit par le passage d'un état global d'hyperméthylation à un état global hypométhylation. La méthylation de l'ADN est un mécanisme décrit comme crucial dans la régulation de l'expression génique (Lessard & Crabtree 2010). En effet, il est admis qu'une zone hyperméthylée d'ADN défavorise

la fixation de la machinerie transcriptionnelle. Une cellule mature possède un génome globalement hyperméthylé comparativement à un progéniteur plus précoce (Suelves et al. 2016). Leur haut niveau de méthylation s'explique par le niveau de spécialisation de la cellule, qui va optimiser sa réponse pour un nombre restreint de stimuli lui permettant sa fonction. Cela s'oppose à la pluripotence des cellules souches où le faible niveau de méthylation de l'ADN permet à la cellule de répondre à une multitude de signaux, lui conférant ainsi une grande plasticité.

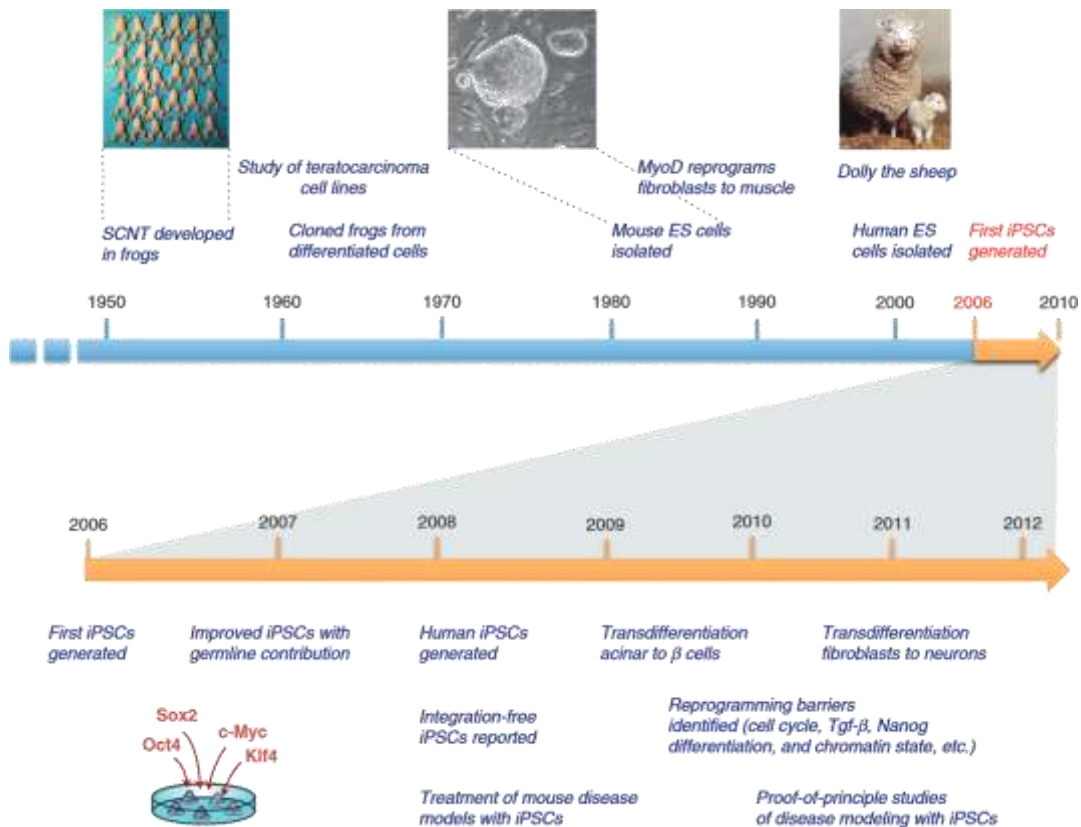


Figure 20 : Frise chronologique des avancées techniques et moléculaires entre 1950 et 2012 dans le domaine de la reprogrammation cellulaire. (D'après Hochedlinger & Jaenisch 2015)

La génération d'iPSCs par cette méthode a été validée au sein d'une large variété d'autres types cellulaires tels que les kératinocytes (Aasen et al. 2008), les cellules neuronales (Kim et al. 2008), les mélanocytes (Utikal et al. 2009) ainsi que des lymphocytes T (Eminli et al. 2009) et B matures (Hanna et al. 2008). Ces résultats corroborent l'existence d'un réseau de régulation transcriptionnelle de reprogrammation efficace quel que soit le lignage d'origine. Il est aussi rapporté que plus le niveau de différenciation est élevé, moins le processus de reprogrammation en iPSCs est efficace. Cela a été démontré dans le système hématopoïétique où la proportion de cellules progénitrices capables d'être reprogrammées était d'environ de 10

à 40% (Stadtfield et al. 2010) contre 0,01 à 0,1% pour des cellules lymphoïdes ou myéloïdes matures (Eminli et al. 2009). L'induction de la pluripotence dans différents systèmes cellulaires a révélé que la reprogrammation en iPSCs se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, les gènes de différenciation somatique sont peu à peu réprimés puis il se met en place un programme transcriptionnel de pluripotence (Figure 21). Ceci s'explique par le fait que les facteurs de Yamanaka ne possèdent pas tous la même cinétique d'action. En effet, seule l'expression précoce de Klf4 est rapportée comme améliorant l'efficacité de la reprogrammation fibroblastique, ce qui lui suggère une action antérieure (Markoulaki et al. 2009). L'activité de c-myc semble s'individualiser des autres facteurs de Yamanaka par le ciblage spécifique de gènes de prolifération cellulaire et de métabolisme (Sridharan et al. 2009). Il est intéressant de noter que l'accélération de la reprogrammation permise par c-myc semble être liée à l'utilisation de mécanismes de division asymétrique. Ces divisions asymétriques permettent en effet d'optimiser la perte de facteurs d'identité somatique, tout en accumulant ceux liés à la pluripotence (Song et al. 2021). Cette hypothèse est corroborée par le fait que les iPSCs générées précocement sont discernables aux niveaux transcriptionnel et épigénétique de celles obtenues après plusieurs divisions (Chin et al. 2009; Polo et al. 2010).

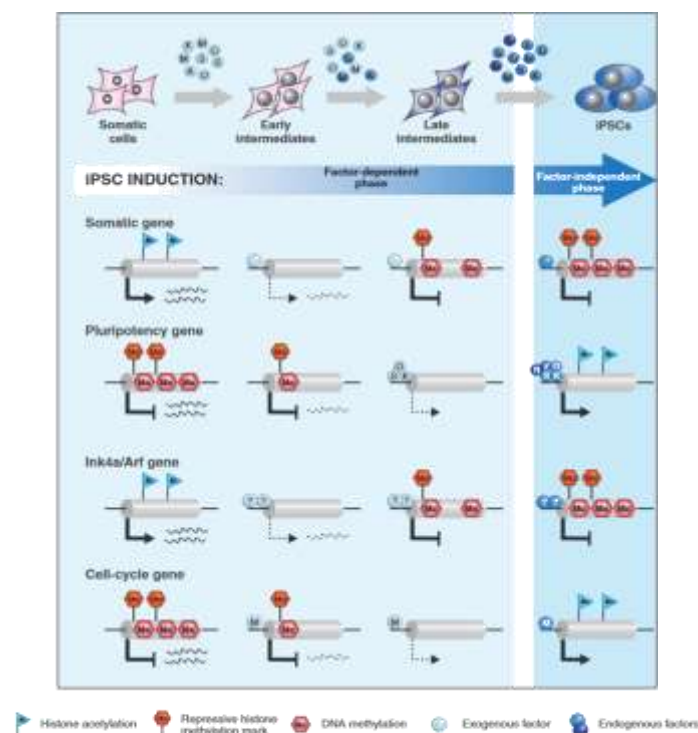


Figure 21 : Illustration schématique de différents cas de polarisation cellulaire associée à une asymétrie de répartition de matériel non-génétique. (D'après Hochedlinger & Jaenisch 2015)

### 3) Modèle de pluripotence par balancement

Le réseau de pluripotence peut différer selon le lignage cellulaire et il est reporté que l'ensemble des facteurs de Yamanaka n'est pas forcément nécessaire. Ceci a été souligné dans le cas de c-Myc qui interviendrait davantage pour accélérer le processus de reprogrammation que pour réguler directement le réseau transcriptionnel de plasticité (Sridharan et al. 2009). Il est par exemple décrit que c-Myc n'est pas obligatoire pour la reprogrammation de cellules proliférative (Nakagawa et al. 2008). D'autre part, malgré que Oct4 ait été considéré pendant longtemps comme le facteur de transcription le plus important de l'induction des iPSCs, de nombreuses études ont montré qu'il pouvait être remplacé (Shu et al. 2013) ou même être non nécessaire à la reprogrammation (Velychko et al. 2019). L'ensemble de ces observations a permis de mettre en place un modèle lié à la pluripotence dit de « balancement ». Dans celui-ci, c'est la combinaison de la dédifférenciation et d'un état d'équilibre pour l'induction des différents lignages possibles qui permet la pluripotence (Figure 22).

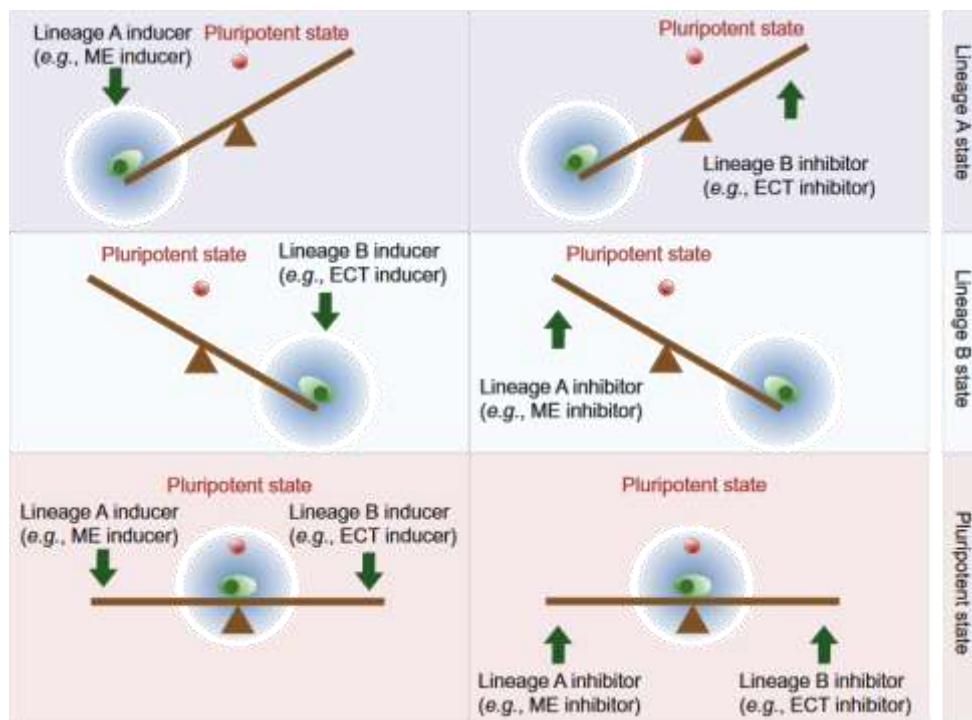


Figure 22 : Schéma du modèle de balancement pour la pluripotence. Les nuages bleus indiquent les destinées cellulaires susceptibles d'être adoptées. L'état de pluripotence (cellule rouge) est situé près de la région d'équilibre. Lorsque la bascule est équilibrée entre les deux potentiels de différenciation, la cellule a une probabilité plus élevée d'entrer dans un état de pluripotence. ME signifie mésoderme et ECT signifie ectoderme. (D'après Shu & Deng 2013)



#### 4) Transdifférenciation directe

Différentes expériences montrent que des facteurs de transcription spécifiques de lignage peuvent aussi être utilisés pour reprogrammer des cellules. Afin de reprogrammer des fibroblastes humains en iPSCs, il est démontré que GATA3 et ZNF521 peuvent se substituer à OCT4, alors qu'OTX2 et PAX6 peuvent se substituer à SOX2 (Montserrat et al. 2013). Les programmes moléculaires des différents lignages induits par ces facteurs de transcription s'équilibrent et permettent la pluripotence. Ce modèle est aussi corroboré par des cas de reprogrammation directe par des spécifiques de lignage. Dans ces cas, la transdifférenciation peut être permise sans l'utilisation d'un seul facteur de Yamanaka. Il est par exemple reporté que l'expression de MyoD dans des fibroblastes est suffisante pour les convertir en myoblastes (Davis et al. 1987). D'autres cas de transdifférenciation directe par des spécifiques de lignage ont été reportés pour convertir des fibroblastes en neurones (Vierbuchen et al. 2010) ainsi qu'en cardiomyocytes (Jeda et al. 2010). Enfin, ces mécanismes de transdifférenciation directe ont aussi été observés pour générer des cellules du lignage hématopoïétique par la surexpression d'Oct4 dans des fibroblastes (Szabo et al. 2010).

Il existe de nombreux facteurs de transcription spécifiques du lignage hématopoïétique qui permettent d'établir la spécification et/ou l'engagement dans les lignages myéloïde, lymphoïde, érythroïde et mégacaryocytaire. Parmi eux, les facteurs Runx1, Cebpa/b, Gata1, Myb, E2A, TAL1, PU.1 et PAX5 sont démontrés comme cruciaux pour la spécification des différents lignages hématopoïétiques. Leurs actions passent par le recrutement de cofacteurs permettant l'activation des gènes spécifiques d'un lignage, de façon concomitante avec la répression de l'activité des facteurs de transcription des autres lignages. Il s'agit d'un réseau de régulation transcriptionnelle complexe où chaque facteur de transcription compétitionne avec les autres afin d'orienter définitivement la cellule vers le lignage qui lui est spécifique. Dans ce contexte, des modifications de la dose de ces facteurs ont été incriminées dans des gains de plasticité et de transdifférenciation hématopoïétiques. Des expériences de surexpression de GATA1 au sein de progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes ont démontré que ces progéniteurs étaient détournés vers le lignage erythro-mégacaryocytaire (Iwasaki et al. 2003; Kulesa et al. 1995). Il est aussi reporté que l'expression ectopique de CEBP $\alpha$  permet de transdifférencier efficacement des progéniteurs B RAG2<sup>-/-</sup> directement en macrophages (Xie et al. 2004; Di Tullio et al. 2011). A l'inverse, les cellules lymphoïdes déficientes pour le facteur de transcription PAX5 deviennent indécises pour le lignage lymphoïde et gagnent une plasticité leur permettant de se différencier dans de nombreux autres lignages (Nutt et al. 1999).

## 5) Plasticité induite par l'absence de PAX5 dans les progéniteurs B

En effet, la perte de Pax5 dans la lymphopoïèse est décrite comme amenant une susceptibilité à se différencier. Les expériences menées par l'équipe de Busslinger ont démontré que les progéniteurs B PAX5<sup>-/-</sup> sous l'action des cytokines appropriées (Figure 23) étaient capables de se différencier en macrophages, ostéoclastes, cellules dendritiques, granulocytes et cellules NK *in vitro* (Nutt et al. 1999). De plus, cette plasticité a été confirmée directement chez l'animal où la transplantation de progéniteurs B PAX5<sup>-/-</sup> est associée à la génération *in vivo* de lymphocytes T (Rolink et al. 1999), mais aussi de macrophages, de granulocytes et d'érythrocytes (Schaniel et al. 2002). La plasticité permise en absence de PAX5 semble être indépendante du niveau de différenciation du lymphocyte B. En effet, la délétion conditionnelle de PAX5 dans des lymphocytes B matures les rendent capables de se différencier en lymphocyte T par une étape préalable de dédifférenciation (Cobaleda et al. 2007). Une susceptibilité à se différencier pour d'autre lignage est aussi reportée dans des conditions Ebf1<sup>-/+</sup> (Nechanitzky et al. 2013) et Pax5<sup>-/+</sup> Ebf1<sup>-/+</sup> (Ungerback et al. 2015) où des progéniteurs B CD19<sup>+</sup> deviennent capables de greffer chez la souris et de générer des lymphocytes T. Mis ensemble, ces résultats soulignent l'importance de l'activité de PAX5 et de sa dose dans la répression de la plasticité cellulaire des lymphocytes B.

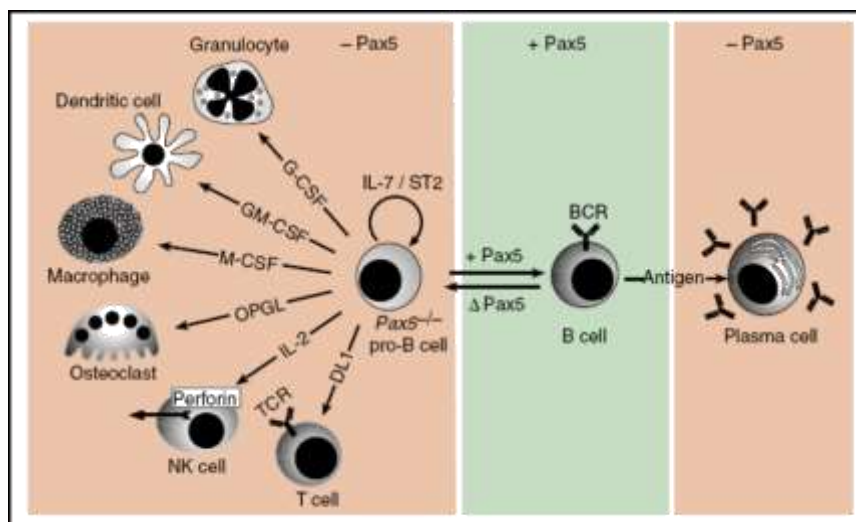


Figure 23 : Schéma représentatif de l'action de PAX5 pour l'engagement dans le lignage B. Les progéniteurs B Pax5<sup>-/-</sup> non engagés deviennent alors capables de se différencier en type de cellules matures en présence des cytokines adaptées. OPGL : Osteoprotegerin ligand, ST2 : stromal ST2 cells. (D'après Cobaleda, Schebesta, et al. 2007)

## II / La lymphopoïèse B

### II.1 - Caractérisation phénotypique

#### II.1.A - Chez la souris

La lymphopoïèse B est un processus finement régulé se déroulant dès le développement fœtal puis dans la moelle osseuse après la naissance. Deux approches phénotypiques différentes sont utilisées chez la souris afin de séparer les stades de la différenciation B. Il s'agit des nomenclatures de Basel et de Philadelphie qui ont été mises en place par Anthony Rolink et Richard Hardy, respectivement. Ces deux nomenclatures utilisent l'expression du B220 ou du CD19 comme marqueurs précoces du lignage B ainsi que l'expression de surface des immunoglobulines pour les cellules matures. Cependant, elles se distinguent par l'utilisation d'autres marqueurs. La nomenclature de Basel utilise l'expression du CD117 (kit) et CD25 (Rolink & Melchers 1996) alors que la classification de Hardy se base sur l'expression du CD43, CD24 et CD249 (BP-1) (Hardy & Hayakawa 2001). Ce sont les modulations d'expressions de ces marqueurs qui permettent de définir les différents stades de la différenciation B (Figure 24). La lymphopoïèse B est donc constituée d'une succession d'étapes comprenant les stades pré-pro-B (Fraction A), pro-B (Fraction B), pré-BI (Fraction C), pré-BII précoce (Fraction C'), pré-BII tardive (Fraction D), immature B (Fraction E) et mature recirculante B (Fraction F).

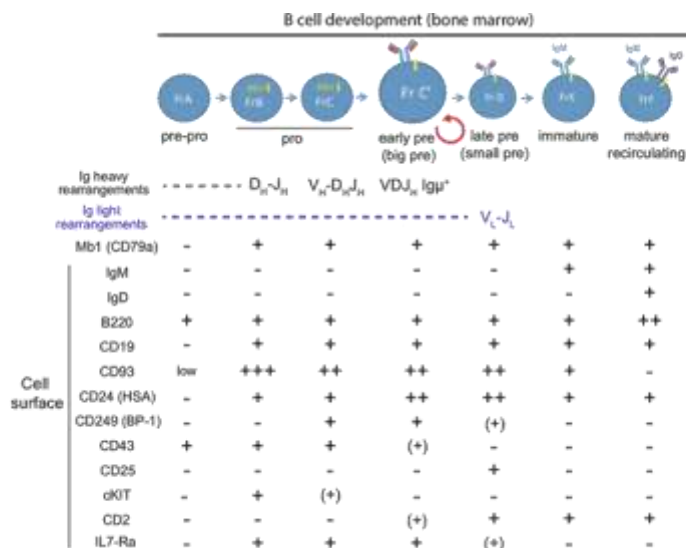


Figure 24 : Classification phénotypique de la différenciation B murine discriminant les stades de la lymphopoïèse B dans la moelle osseuse. Les marqueurs représentés incluent ceux de la nomenclature de Philadelphie et de Basel. (D'après Monzón-Casanova et al. 2020)

## II.1.B - Chez l'Homme

La différenciation B humaine présente de nombreuses similitudes avec celle de la souris. En effet, de nombreux marqueurs identifiés chez la souris sont utilisés afin de caractériser phénotypiquement la différenciation B humaine (Ghia et al. 1998). Ce phénotypage passe par l'utilisation des marqueurs CD34, CD38, CD10, CD19, ainsi que l'expression d'immunoglobulines de surface (Figure 25). L'acquisition successive de ces différents marqueurs a été mise en évidence par des approches de culture *in-vitro* de CSHs CD34<sup>+</sup> (Kraus et al. 2013) mais aussi à partir de la différenciation de cellules souches embryonnaires humaines pluripotentes (Böiers et al. 2018; Richardson et al. 2021). Parmi les différences notables entre l'Homme et la souris, on ne retrouve pas d'expression concomitante de KIT avec celle du CD19 et le marqueur B220 n'est pas exprimé chez l'Homme.

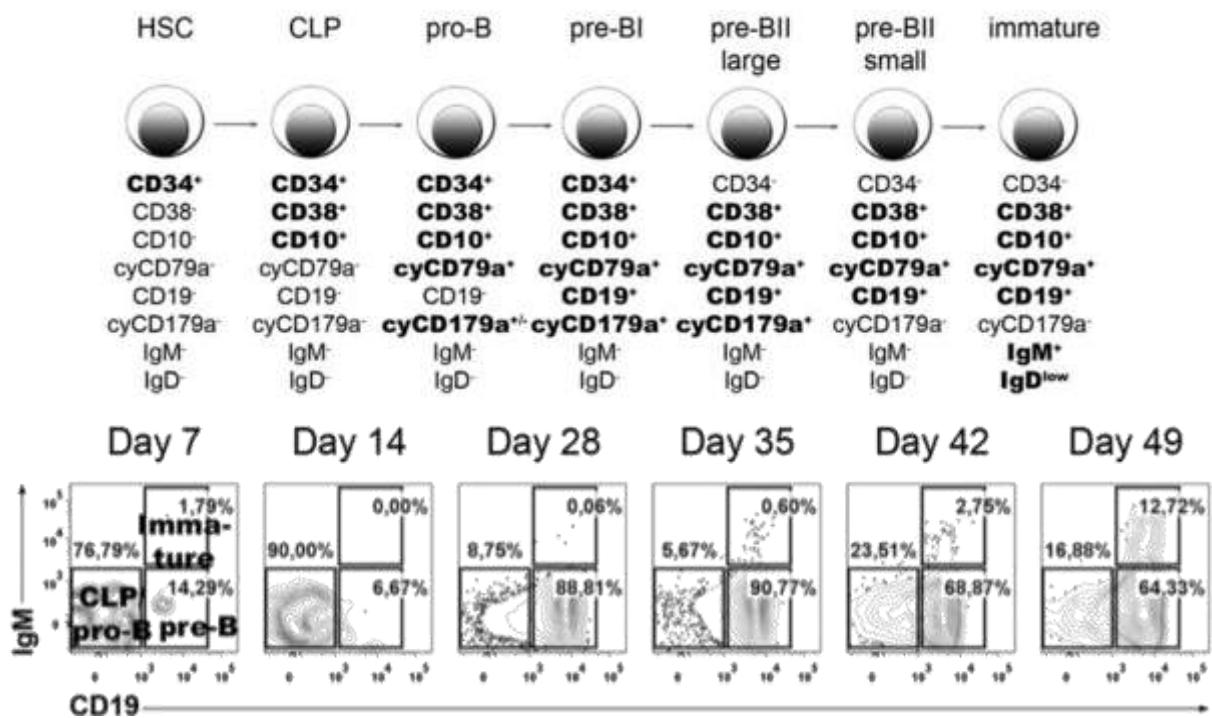


Figure 25 : Classification phénotypique de la différenciation B humaine permettant de discriminer les stades de la lymphopoïèse B (Panel du haut). Résultats représentatifs de culture de CSHs CD34<sup>+</sup> humaine dans des conditions permettant l'avancée dans la différenciation B (Panel du bas). (D'après (Kraus et al. 2013))

Cependant, la caractérisation phénotypique précise de l'ensemble de la lymphopoïèse B humaine est longtemps restée évasive après celle de la souris. C'était sans compter le développement des approches à l'échelle uni-cellulaire qui apportèrent de nouvelles perspectives d'analyse. Notamment, l'approche de cytométrie de masse (Cytof) permis à

l'équipe de Gary Nolan d'analyser l'ensemble de la trajectoire développementale de la lymphopoïèse B à l'aide d'un seul panel de marquage (Figure 26). 44 marqueurs comprenant des protéines de surfaces, des facteurs de transcription, des enzymes ainsi que des protéines phosphorylées ont été quantifiés, afin de dériver statistiquement la trajectoire prise par chaque cellule dans le processus de différenciation (Bendall et al. 2014). Pour cela, les auteurs ont développé l'algorithme de pseudotime « Wanderlust », qui fut le premier de son genre avant que ce type d'analyse ne se démocratise grâce aux expériences de Sc-RNAseq. Cette étude indique notamment que l'expression de la protéine CD24 et de l'enzyme TdT peut être combinée à celle des marqueurs canoniques de l'engagement B (CD10 et CD19), afin de préciser la lymphopoïèse B humaine. Les résultats suggèrent aussi que l'initiation de l'expression de certains marqueurs phénotypiques (CD19) peut différer entre l'Homme et la souris (Cobaleda & Sánchez-García 2009). Pour finir, leur approche confirme que les différenciations B humaine et murine suivent les mêmes étapes de développement impliquant le réarrangement des immunoglobulines ainsi que les voies de signalisation induite par l'IL7R et le pré-BCR que je détaillerai plus loin dans ce manuscrit.

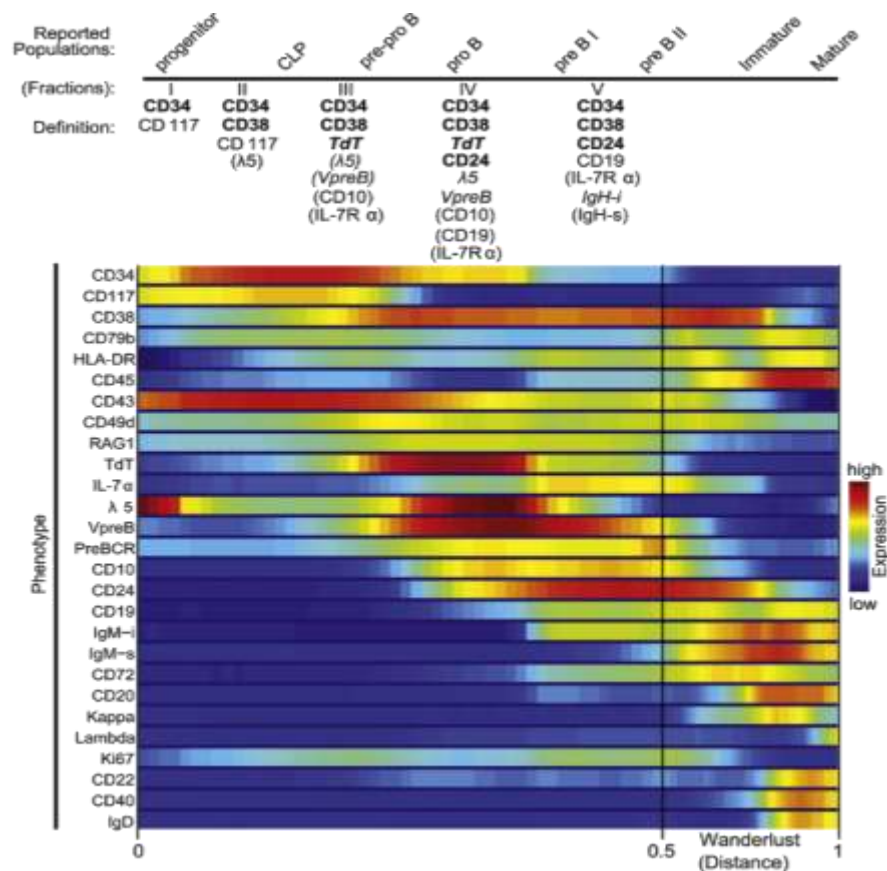


Figure 26 : Heatmap des valeurs normalisées de chaque marqueur phénotypique aligné selon le temps de développement calculé par Wanderlust. (D'après Bendall et al. 2014)

## II.2 – Lymphopoïèse B de la moelle osseuse

### II.2.A – Entrée dans le lignage lymphoïde

Comme abordé précédemment, une fois que les CSHs se divisent de façon asymétrique en une cellule souche et un progéniteur biaisé dans la différenciation, ce dernier va pouvoir se diriger vers un lignage spécifique. Les progéniteurs multipotents biaisés pour le lignage lymphoïde (MPP4 aussi appelé LMPP pour progéniteurs multipotents lymphoïdes) ont la capacité de se différencier progressivement en des précurseurs de plus en plus engagés dans le lignage lymphoïde. La discrimination phénotypique de l'engagement lymphoïde passe par l'expression du Flt3 pour les MPP4 puis de l'IL7R pour les CLP (Figure 26). Les cellules MPP4 ont été montrées comme capables de générer des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) qui se différencient en cellules pré-pro-B puis en cellules pro-B. Ce dernier stade finira de restreindre le devenir cellulaire à la lymphopoïèse B uniquement. Le passage du stade CLP au stade pro-B est encore étudié de nos jours. En effet, l'étape de la différenciation précédant la restriction complète du lignage B a longtemps fait débat dans le domaine.

Il a tout d'abord été établi qu'une hétérogénéité au sein de la population des CLPs existait mais que les cellules exprimant le marqueur Ly6D se restreignaient définitivement pour le lignage B (Inlay et al. 2009). C'est pourquoi le Ly6D fut utilisé afin de séparer les progéniteurs lymphoïdes totaux (ALP) Ly6D négatif, et les progéniteurs lymphoïdes B (BLP) Ly6D positif (Figure 27). Ce résultat ne concordait cependant pas avec le fait que les cellules pré-pro-B (Lin<sup>-</sup>, IL7R<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>), plus avancée dans la différenciation, restaient capables de générer des cellules myéloïdes (Rumfelt et al. 2006). Ceci a amené à l'hypothèse de l'existence de population encore bi-potente, notamment pour le lignage myéloïde, se situant plus loin dans la différenciation que le stade CLPs. Ce n'est que plus récemment, avec l'avancée des technologies de séquençage à l'échelle unicellulaire, que l'équipe de Rolink a été capable de discriminer et caractériser entièrement l'ensemble de l'hétérogénéité retrouvée au sein des progéniteurs B220<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> (Alberti-Servera et al. 2017). Son approche a permis de définir que le marqueur Ly6D, bien qu'enrichissant fortement en signature et potentiel de différenciation B, n'était pas suffisant pour discriminer spécifiquement les progéniteurs précoces du lignage B. De plus, les résultats ne supportent pas l'hypothèse de progéniteurs encore bi-potent à ce stade de la différenciation. La fraction cellulaire B220<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> Ly6D<sup>+</sup> est donc constituée de multiples sous-populations cellulaires possédant des expressions différentes pour des gènes impliquées dans le lignage B, T, myéloïde et dendritique. Ces résultats sont soulignés par la caractérisation plus fine de la différenciation des cellules dendritiques conventionnelles (cDC)

qui démontre que des progéniteurs dendritiques expriment le Ly6D puis le B220 (Lutz et al. 2022). De plus, des approches de « barcoding » ont démontré que la génération des cDC était spécifique des MPP4 et de la signalisation induite par le récepteur Flt3 à ce stade de la différenciation (Lin et al. 2021).

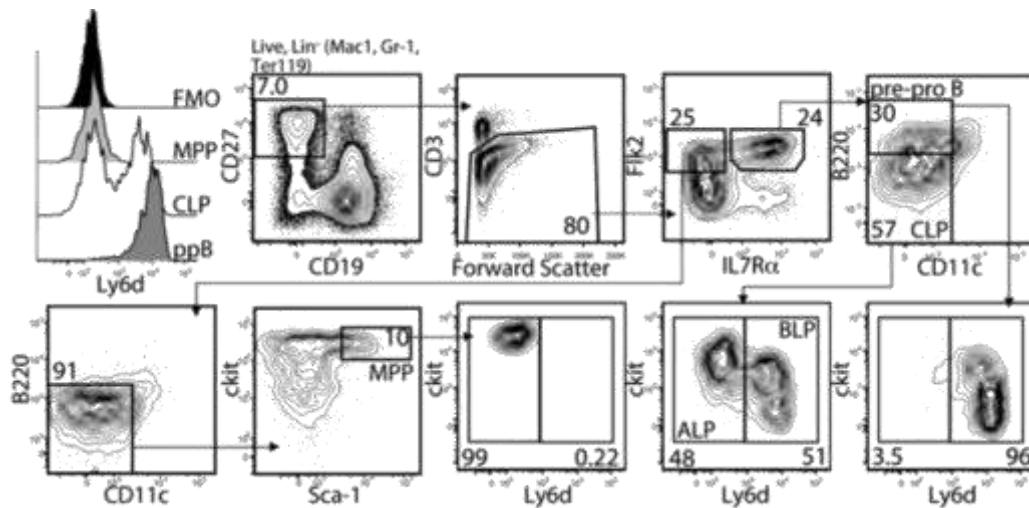


Figure 27 : Stratégie de fenêtrage définie par le laboratoire de Weissman afin de discriminer les précurseurs les plus précoces de l'entrée dans la différenciation B. (D'après Inlay et al. 2009)

### II.2.B – Le réarrangement des immunoglobulines comme marqueur de la lymphopoïèse

L'avancée dans la différenciation B est accompagnée du processus de réarrangement des gènes des immunoglobulines. Ce processus sert à générer à terme l'ensemble de la diversité du répertoire des anticorps. En effet, afin de permettre une couverture immunitaire complète, une immunoglobuline spécifique de chaque antigène doit pouvoir être générée. Ceci est rendu possible par des mécanismes moléculaires complexes, capables d'augmenter étape après étape la diversité de reconnaissance des immunoglobulines. Je ne parlerai pas ici exhaustivement de ces mécanismes, préférant me focaliser uniquement sur la maturation des lymphocytes B précoces se déroulant dans la moelle osseuse.

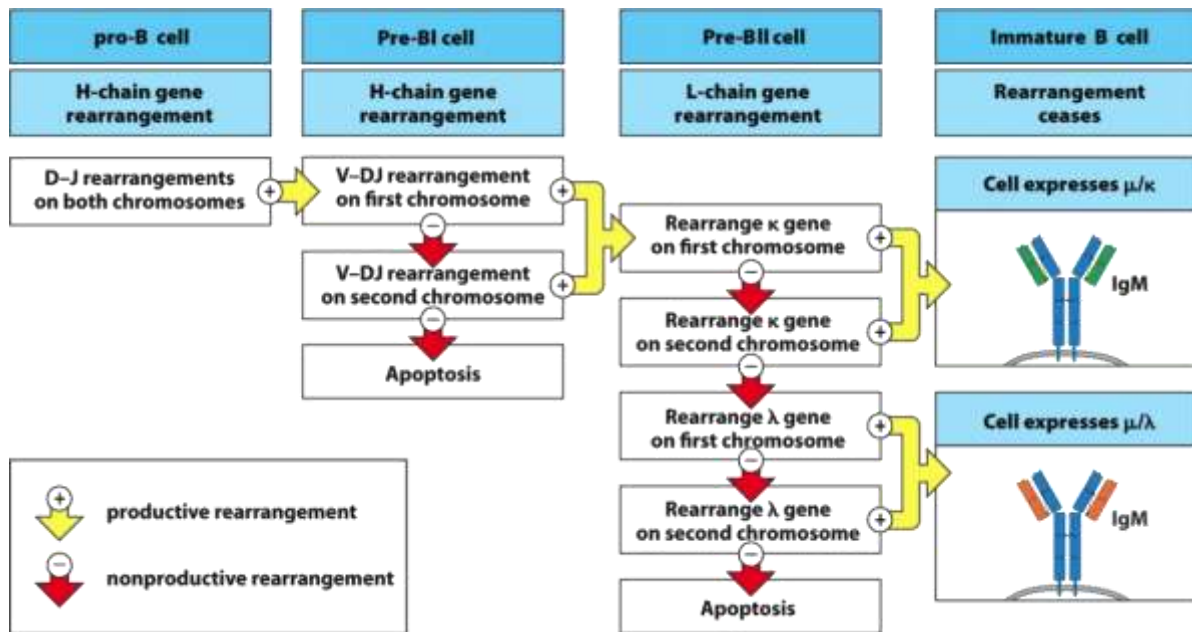


Figure 28 : Schéma des réarrangements successifs des gènes des immunoglobulines lors de la différenciation B.

Dans la moelle osseuse se déroule successivement le réarrangement somatique des loci du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) puis celui des loci du gène des chaînes légères (IgL). Pour les chaînes lourdes des immunoglobulines, une recombinaison V(D)J induit l'assemblage des segments D (diversité) avec les segments J (jonction) puis celui des segments V (variable) avec les segments DJ réarrangés (Figure 28). Le réarrangement des segments DJ a lieu au stade pro-B et celui des segments VDJ au stade pre-BI. Afin de réaliser ces recombinaisons, de courtes séquences de 12 nucléotides pour les régions D et de 23 nucléotides pour les régions V et J, appelées signaux de recombinaisons (RSS), sont reconnues sur l'ADN par deux enzymes Rag (Rag1 et Rag2). Ces enzymes possèdent une activité endonucléase (Figure 29). Chez la souris, la diversité sera générée à partir du réarrangement de 97 segments variables, de 4 segments de jonction et 14 de diversité (Giudicelli et al. 2006). Chez l'Homme, le même mécanisme a été décrit avec cependant une diversité de segments plus faible, entre 38 et 46 segments variables, 23 segments de diversité et 6 segments de jonction. Le complexe formé par Rag1 et Rag2 va interagir avec un RSS de 12 nucléotides (D) et un RSS de 23 nucléotides (V ou J) respectivement. Ces interactions induisent un changement conformationnel du complexe, rapprochant les régions RSS de l'ADN pour ensuite réaliser leurs clivages double brins (Ru et al. 2015). Après ce clivage, la machinerie de réparation de l'ADN, dite « erreur prône », NHEJ (*non homologous end joining*), intervient afin de fusionner les deux extrémités des régions clivées, tout en incorporant des erreurs d'insertions et/ou de délétions de nucléotides au niveau de la jonction. Ces erreurs augmentent la diversité moléculaire des



immunoglobulines. La double coupure induite par les enzymes RAG entraîne la perte du brin d'ADN se situant entre les deux segments. Ce mécanisme impliquant les protéines Rag est utilisé à chaque étape de recombinaison, que cela soit pour les chaînes lourdes ou légères des immunoglobulines.

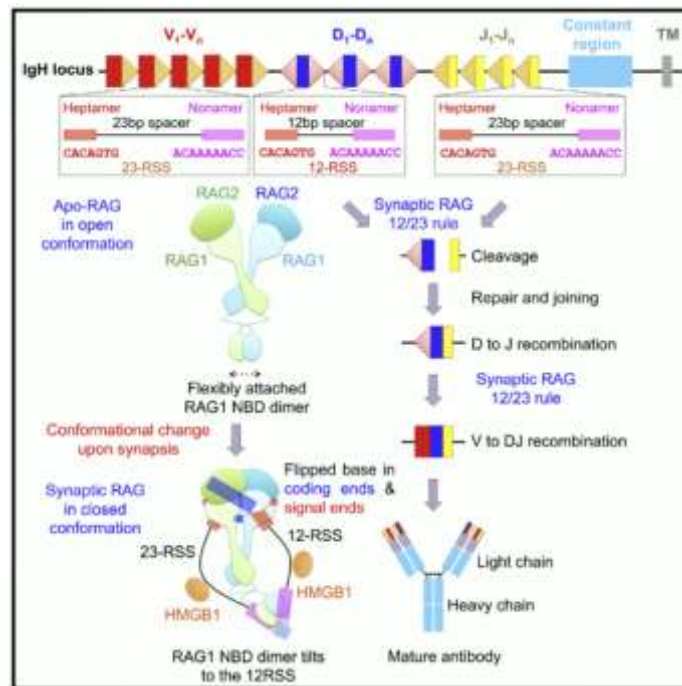


Figure 29 : Illustration schématique de l'action des enzymes RAG dans les mécanismes de réarrangements des immunoglobulines. (D'après Ru et al. 2015)

Le réarrangement des immunoglobulines a lieu de façon séquentiel. En effet, les réarrangements DJ débutent sur les deux allèles, puis les réarrangements VDJ se déroulent sur un seul allèle à la fois. Le second allèle initie son réarrangement uniquement dans le cas d'un réarrangement infructueux du premier. En effet, une étape de « checkpoint » permet de déterminer si le réarrangement est productif ou non. Pour les chaînes lourdes des immunoglobulines, le « checkpoint » a lieu par l'intermédiaire du pré-BCR alors que les chaînes légères des immunoglobulines sont validées dans la différenciation plus tardive, par l'intermédiaire du BCR. Le pré-BCR est constitué d'une chaîne lourde nouvellement réarrangée ainsi que de deux pseudo-chaînes légères : le CD179a (VpreB) et le CD179b (lambda5). Une fois externalisé, ce complexe s'associe en intra-cellulaire avec les protéines Iga (CD79a) et Igb (CD79b). Iga et Igb sont capables de transduire un signal du cytoplasme au noyau en cas d'activation du pré-BCR. L'étape de « checkpoint » consiste à valider la réactivité du complexe du pré-BCR, qui peut être amoindrie en cas de production d'une chaîne lourde des immunoglobulines tronquées ou incapables de lier correctement les pseudo-chaînes.

## II.2.C – Validation des réarrangements des immunoglobulines

### II.2.C.a Validation des réarrangements IgH par le pré-BCR :

Les cellules pré-BII précoces externalisent le pré-BCR ce qui initie la phase de validation des chaînes lourdes des immunoglobulines. La compréhension exacte du mécanisme moléculaire permettant la transduction du signal du pré-BCR reste débattue. Il est cependant admis que les complexes de pré-BCR doivent s'agréger ensemble à la membrane pour transduire efficacement une signalisation intra-cellulaire. C'est cette agrégation couplée à l'auto-réactivité de la partie non-immunoglobuline de lambda5 (Ohnishi & Melchers 2003) qui permet de transduire le signal validant le premier checkpoint. Cette mise en commun des complexes de pré-BCRs est dépendante de lambda5 et est accompagnée de la ligation de molécule du micro-environnement. C'est notamment le cas de la Galectin 1 (Gauthier et al. 2002) qui interagit spécifiquement avec le complexe du pré-BCR. Il est rapporté que le BCR interagit quant à lui avec la Galectin 9 (Cao et al. 2018). Par la suite, d'autres équipes ont démontré que l'agrégation du Pré-BCR était indépendante de tout ligand (Bankovich et al. 2007), mais que la stabilité de son agrégation était fortement influencée par la présence de Galectin 1 (Erasmus et al. 2016). L'ancrage moléculaire permis par la Galectin 1 au niveau des complexes de pré-BCRs s'accompagne de la formation d'une « synapse » polarisant ainsi la cellule (Figure 30). D'autres protéines du micro-environnement ont été incriminées comme cruciales afin de former cette synapse telles que les intégrines  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4),  $\alpha 5\beta 1$  (VLA-5), et  $\alpha 4\beta 7$ . Celles-ci interagissent avec des ligands des cellules stromales telles que la fibronectine et ADAM15 afin de concentrer le cytosquelette d'actine au niveau du pré-BCR (Rossi et al. 2006; Bonzi et al. 2015).

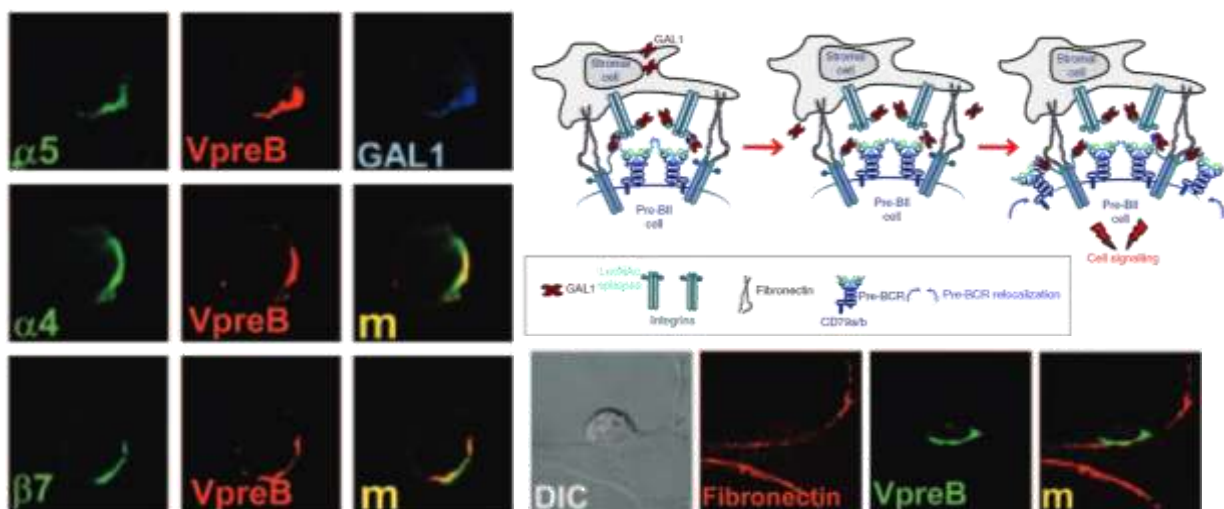


Figure 30 : Analyse par microscopie à immunofluorescence de l'agrégation du pré-BCR et de de différentes intégrines au sein de progéniteurs B. Colocalisation des protéines du pré-BCR, de la galectin1 et de différentes intégrines ( $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 7$ ) visualisée dans un progéniteur B

(*Panel gauche*). Observation de l'interaction entre une cellule pré-B et une cellule du micro-environnement exprimant la fibronectine (*Panel bas droit*). Schéma représentatif des interactions mises en jeu pour la transduction du signal induit depuis le pré-BCR (*Panel haut droit*). m : merge / GAL1 : galectin 1. (D'après Rossi et al. 2006; Bonzi et al. 2015)

De façon intéressante, des processus de polarisation associés à des division asymétriques sont reportés en cas de reconnaissance d'un antigène par le BCR (Thaunat et al. 2012; Hawkins et al. 2013), suggérant que ce type de division pourrait aussi être induit depuis le pré-BCR. La polarisation des progéniteurs B permise par le pré-BCR se passe dans un contexte particulier : elle se forme au sein d'une cellule activement proliférante et est associée à terme à l'arrêt de cette prolifération. En effet, une courte et intense phase de prolifération advient au moment de l'externalisation du pré-BCR et permet de sélectionner les cellules ayant réarrangées correctement leurs IgH. Cette phase amplifie de plus d'un facteur 5 le nombre de chaque clone productif (Rolink et al. 2000). La prolifération est ensuite rapidement écourtée afin de réaliser le réarrangement des IgL. Cette cinétique est très finement régulée de par l'externalisation limité du pré-BCR à la surface des cellules. Cette faible externalisation semble expliqué par l'internalisation rapide et continu du pré-BCR (Ohnishi & Melchers 2003; Knoll et al. 2012) ainsi que la plus faible disponibilité des protéines Lambda5 comparativement aux IgH (Cohen et al. 2013). La signalisation induite depuis le pré-BCR permet l'arrêt de son externalisation. C'est pourquoi, les chaînes lourdes des immunoglobulines resteront internalisées jusqu'à la fin du réarrangement des chaînes légères et la mise en place du complexe final du BCR (IgH + IgL).

### *II.2.C.b Validation des réarrangements IgL par le BCR :*

Les réarrangements des IgL ont lieu à partir du stade de cellules pré-BII tardives et vont permettre la mise en place du complexe du BCR (Figure 31). Une fois le complexe formé en intra-cytoplasmique, il sera acheminé vers la membrane au stade immature-B. Le signal du BCR sera donc transduit à partir de ce stade de la différenciation. Il consiste en la sélection négative des BCR auto-réactifs et de la sélection positive des BCR tolérants pour ses antigènes (Nemazee 2017). Cette sélection positive n'est pas associée à une phase de prolifération mais plutôt à l'arrêt des processus moléculaires de réarrangements ainsi qu'à la sortie des cellules immatures B de la moelle osseuse pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (Pereira et al. 2009; Beck et al. 2014).

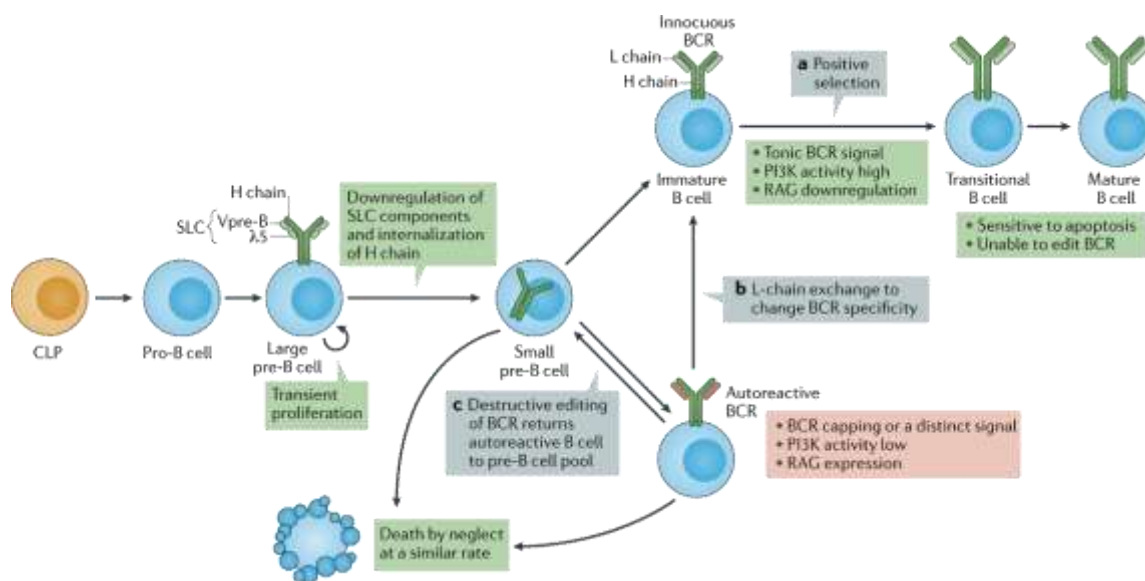


Figure 31 : Schéma de la différenciation B focalisé sur l'étape de validation du BCR. Les chaînes légères s'appariant aux chaînes lourdes induisent la signalisation tonique du BCR. Cette signalisation favorise une sélection positive lorsque le BCR est non auto-réactif (a), ou auto-réactif ou trop peu tonique (b-c). (D'après [Nemazee 2017](#))

## II.2.D – Signalisations moléculaires impliquées dans la différenciation B :

### II.2.D.a Signalisation moléculaire induite par le récepteur à l'interleukine 7 :

L'IL7r est un récepteur composé de l'interaction de la chaîne alpha du récepteur à l'IL7 (IL7 $\alpha$ ) spécifique du lignage lymphoïde et de la chaîne gamma du récepteur à l'IL2 (IL2 $\gamma$ ) qui est retrouvée plus globalement exprimée au sein de l'hématopoïèse. L'IL7 est sécrétée par les cellules stromales de la moelle osseuse, de la rate ainsi que du thymus. L'expression de son récepteur débute très tôt dans le déterminisme du lignage lymphoïde, à partir du stade CLP. La signalisation induite par l'IL7r a été démontrée comme critique pour l'engagement et le développement des lymphocytes B. En effet, les souris KO pour le récepteur ([Corcoran et al. 1998](#)) ou bien la cytokine ([von Freeden-Jeffry et al. 1995](#)) sont presque totalement dépourvues de progéniteurs B. Il semblerait que la lymphopoïèse B humaine ne soit pas exclusivement dépendante de l'IL7, cela s'explique par la redondance d'un autre jeu de récepteur-ligand possédant le même rôle : CRLF2 et TSLP ([Kang & Der 2004](#)). En aval de ces récepteurs se trouvent deux signalisations interconnectées qui jouent des rôles différents dans la lymphopoïèse B. Il s'agit des voies de signalisation JAK/STAT et PI3K/AKT/mTOR. Elles

agissent de concert afin d'induire la survie et la prolifération cellulaire, favorisant ainsi l'avancée dans la différenciation B (Figure 32).

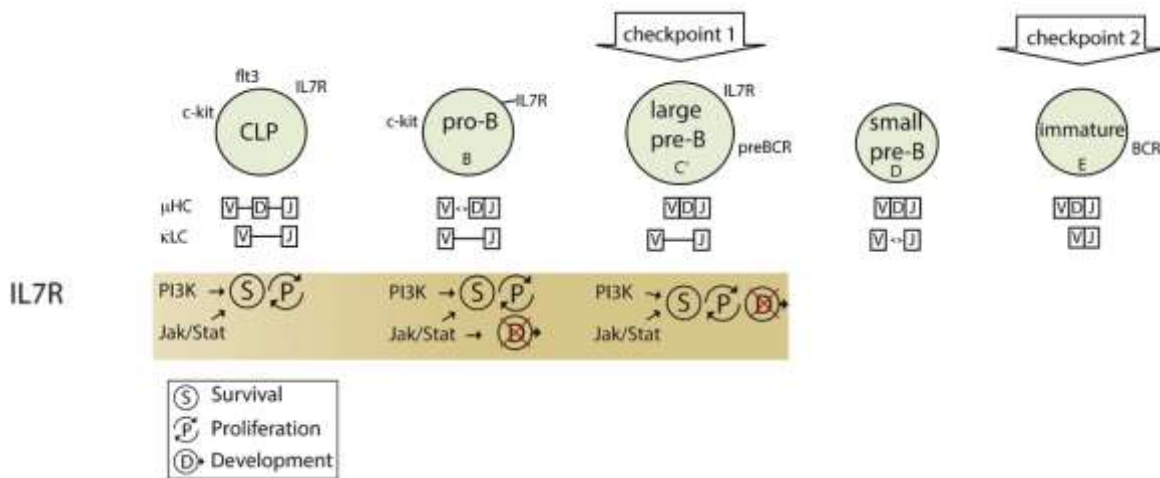


Figure 32 : Schéma des axes de signalisation en aval du récepteur à l'IL7 pendant l'avancée dans la différenciation des progéniteurs lymphocytaires B de la moelle osseuse. (D'après Reth & Nielsen 2014)

### 1) Signal de survie cellulaire

En effet, une signalisation pro-survie est nécessaire au stade pro-B (Fraction B) afin de contrer le signal pro-apoptotique induit par les dommages à l'ADN dû au réarrangement des chaînes lourdes des immunoglobulines. Ce signal de survie est induit notamment par l'intermédiaire de la voie JAK/STAT (Figure 33). Plus précisément, après ligation de l'Il7 avec son récepteur, un changement conformationnel va induire la phosphorylation de la kinase JAK3 (Janus Kinase) et/ou JAK1 qui phosphorylent à leur tour les facteurs de transcription STAT5A/B disponibles dans le cytoplasme. La phosphorylation des facteurs STAT5 permet leur dimérisation, les rendant ainsi capables de se transloquer dans le noyau de la cellule afin d'induire l'expression de gènes pro-survies tels que *BCL2* ou *MCL1* (Jiang et al. 2004). Notamment, des études indiquent que la différenciation B des souris STAT5 KO est arrêtée au stade pro-B (Goetz et al. 2004) et un sauvetage fonctionnel est possible par la surexpression de *BCL2* en absence de STAT5 (Malin, McManus, Cobaleda, et al. 2010). Aussi, il est reporté que la différenciation B en absence d'Il7r redevient partiellement efficace en présence d'une forme constitutivement activée de pSTAT5 dans les cellules (Goetz et al. 2004), soulignant ainsi le rôle central de la voie JAK/STAT en aval de l'Il7r. Cet axe de signalisation est conservé chez l'Homme comme le soulignent les résultats de co-culture de CD34+ de sang de cordon humain en présence ou non d'IL7 (Johnson et al. 2005).

La signalisation pro-survie est aussi dépendante de la voie PI3K (Figure 33). En effet, après son activation, l'IL7R recrute p85 et p110 (PI3K) qui ont pour rôle de phosphoryler les Phosphoinositides phosphate 2 (Pip2) en Phosphoinositides phosphate 3 (Pip3). S'ensuit une cascade de signalisation permettant la répression de la protéine pro-apoptotique BAD (Castellano & Downward 2011) ainsi que la phosphorylation du facteur de transcription Foxo1. Cette phosphorylation entraîne la séquestration de Foxo1 dans le cytoplasme pour sa dégradation et empêche ainsi son action sur ses cibles transcriptionnelles pro-apoptotiques (Danial & Korsmeyer 2004). Le maintien cytoplasmique de Foxo1 est d'autant plus important qu'il empêche l'activation de l'expression des enzymes RAG lors des phases de prolifération, évitant ainsi d'endommager l'ADN lors de la mitose (Ochiai et al. 2012). Ces observations soulignent l'existence de différentes temporalités entre le moment où les progéniteurs B réarrangent leurs immunoglobulines et celui où elles se divisent activement. En effet, à partir du stade de la différenciation pré-BI, la réactivité des cellules pour phosphoryler STAT5 diminue, accompagnée de l'expression du CD249 (BP-1) et d'un plus haut niveau de prolifération. La dépendance de la signalisation induite depuis l'IL7R pour le passage au stade pré-BI est soulignée par des expériences de culture *in vitro* de cellules pro-B où la concentration d'Il7 dans le milieu module l'expression du marqueur BP-1 induit à la surface des cellules.

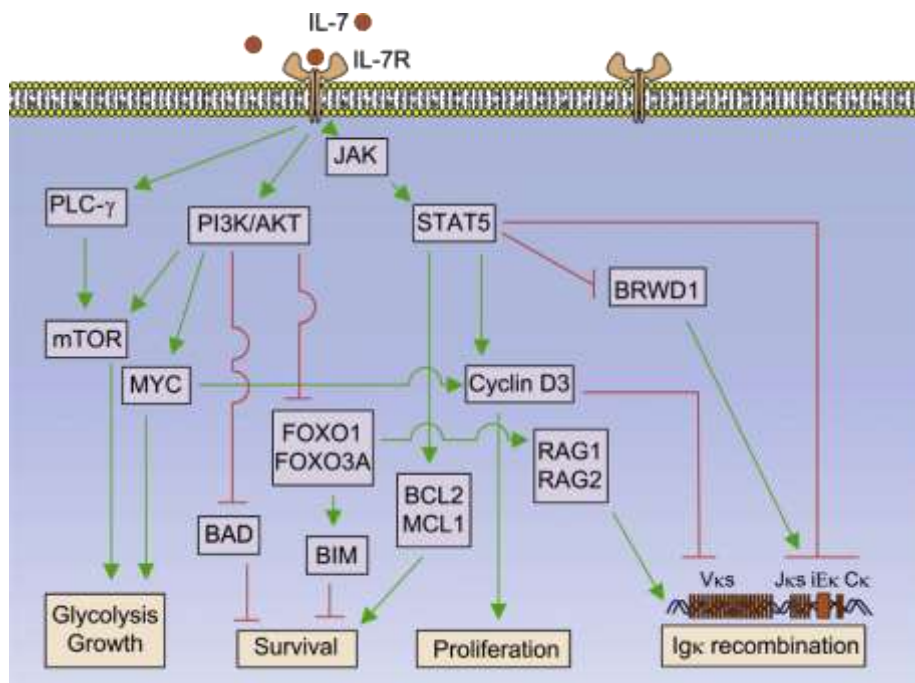


Figure 33 : Schéma des axes de signalisation en aval du récepteur à l'IL7 pendant l'avancée dans la différenciation des progéniteurs lymphocytaires B de la moelle osseuse. (D'après McLean & Mandal 2020)

## 2) Signal de prolifération cellulaire

Le contrôle de la phase de prolifération est permis en partie par l'intermédiaire de STAT5 qui régule l'expression de cyclines importantes pour l'avancée dans le cycle cellulaire telle que CCND3, mais surtout de la signalisation PI3K/AKT. En effet, en absence d'activité catalytique de p110, les cellules pro-B sont beaucoup moins efficaces pour proliférer en présence d'Il7 (Ramadani et al. 2010). De plus, les modèles murins de délétions de Raptor, directement en aval de la signalisation PI3K/AKT, ainsi que de sa cible directe mTORC1, montrent un blocage complet de la différenciation au stade pré-BI (Zeng et al. 2018). Les auteurs ont été capables de discriminer par leurs approches l'axe pro-prolifératif de l'axe pro-survie induits par la signalisation PI3K/AKT mTOR. En effet, ils ont identifié deux voies de signalisation en aval de l'Il7r, indépendantes de STAT5, et cruciales pour le développement B précoce. La première implique la voie AKT de façon non exclusivement dépendante de PI3K (potentiellement PDK1) et transduit un signal pro-prolifératif par l'intermédiaire de Raptor/mTORC1/ Myc. La seconde permet un signal pro-survie sous le contrôle de PI3K et dont la suppression est médiée par PTEN. Cette seconde voie semble jouer un rôle plus précoce dans la différenciation car la délétion de PTEN entraîne un blocage au stade pro-B (Fraction B), associé à une plus forte mortalité cellulaire.

L'activation de Myc à partir du stade pré-BI (fraction C) jusqu'au stade pré-BII précoce (fraction C') est critique pour l'expansion de ces compartiments lors de la différenciation B (Vallespinós et al. 2011). En effet, Myc est directement impliqué dans l'induction de la prolifération cellulaire (Habib et al. 2007), dans le remodelage du cytosquelette d'actine (Iritani & Eisenman 1999), et dans l'activation d'un programme métabolique de glycolyse (Urbanczyk et al. 2018). Sa régulation transcriptionnelle semble être dépendante de la signalisation STAT5 comme l'indiquent plusieurs études (Lord et al. 2000; Pinz et al. 2016). Cependant, son expression protéique ne débute pas dès le stade pro-B, mais plus tardivement dans la différenciation (Sandoval et al. 2013). C'est pourquoi il est suggéré que sa traduction n'est rendue possible que lorsque l'axe signalétique Raptor/mTORC1 est activé (Zeng et al. 2018). Cette activation est transitoire et advient de façon concomitante avec l'externalisation du pré-BCR.

## *II.2.D.b Signalisation moléculaire induite par le Pre-BCR :*

### **1) Signal de prolifération cellulaire**

Conjointement à l'activation autonome du pré-BCR, se déclenche une signalisation complexe impliquant la famille des SRC kinases (tyrosine kinase non-récepteur), la voie PI3K/AKT mTOR et la voie ERK/MAPK. Le signal en aval du pré-BCR passe par l'intermédiaire des SRC kinases LYN et FYN et BLK qui vont phosphoryler les motifs ITAMs se trouvant à l'extrémité des protéines CD79a et CD79b. Les phosphorylations des motifs ITAMs vont permettre de recruter la kinase SYK, induisant son autophosphorylation et décuplant ainsi son activité kinase. Le rôle majeur de SYK pour la voie du pré-BCRs a été révélé par la mise en place d'un modèle murin délété pour ce gène. Ce modèle démontre qu'en absence de SYK, la différenciation B est bloquée avant le stade des cellules pré-BII tardives (Fraction D), étape de la différenciation suivant l'externalisation du pré-BCR (Cheng et al. 1995; Turner et al. 1995). De plus, SYK a directement été incriminé dans le mécanisme de prolifération des cellules pré-BII précoces (Fraction C'). En effet, la surexpression de SYK chez des progéniteurs B permet d'induire fortement leur prolifération en présence d'IL7 et du pré-BCR. Cette prolifération est liée à l'augmentation de la quantité de protéine MYC dans les cellules (Wossning et al. 2006). D'autres études ont confirmé que cette activité pro-proliférative de SYK était dépendante de la voie PI3K/AKT/mTOR (Kanie et al. 2004). En effet, SYK induit la phosphorylation de la protéine adaptatrice BCAP qui, en interagissant avec CD19, active par phosphorylation les PI3Ks (Aiba et al. 2008). SYK semble donc capable d'amplifier, ainsi que de prendre le relais de la voie de l'IL7R pour induire la prolifération par l'intermédiaire de la voie PI3K (Figure 34). Cependant, comme abordé précédemment, ce signal pro-prolifératif est finement régulé pour n'être que de courte durée.



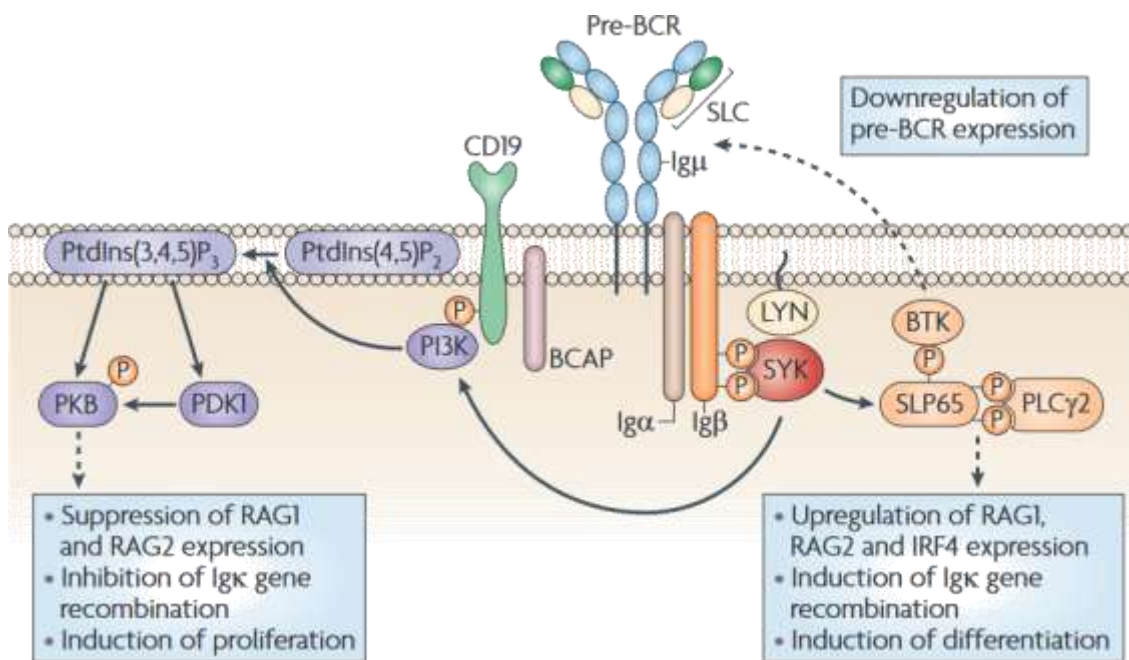


Figure 34 : Schéma des axes de signalisation en aval du récepteur à l'IL7 pendant l'avancé dans la différenciation des progéniteurs B de la moelle osseuse. (D'après Rickert 2013)

## 2) Signal de différenciation cellulaire

La régulation du signal de différenciation est permise par un autre axe de signalisation induit depuis le pré-BCR (Figure 34). Elle passe par l'intermédiaire de la kinase SYK, de BTK et de la protéine adaptatrice BLNK (SLP65). BLNK est capable d'inhiber la voie des PI3K (Ochiai et al. 2012) ainsi que de contrôler la prolifération et la différenciation des cellules pré-BII précoces. En effet, dans les modèles murins délétés pour BLNK, la différenciation B est bloquée au stade pré-BII précoce qui prolifère alors de façon continue (Jumaa et al. 1999; Flemming et al. 2003). La phosphorylation de BLNK par SYK induit une cascade de signalisation impliquant le recrutement des protéines PLCγ2, BTK et GRB2. Cette cascade permet d'activer l'expression de facteurs de transcription pro-différenciation tels que Aiolos (Ikzf3) et IRF4. Ces facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de l'arrêt du cycle cellulaire, dans l'activation du réarrangement des IgL ainsi que dans la répression des composants du pré-BCR tels que Lambda5 pour Aiolos. La signalisation du pré-BCR permet aussi une entrée de calcium dans la cellule. Ce calcium va entraîner la phosphorylation de PLCγ2 par BTK qui sont tous deux complexés à BLNK. BTK est recruté au préalable au niveau des Pip3 de la membrane qui ont été générés par l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR via SYK. Une fois phosphorylé, Plcg2 va entraîner le passage des Pip2 en IP3, ce qui aura pour conséquence de compétitionner avec la cascade de signalisation des PI3K pour la formation de Pip3. L'inhibition de la voie PI3K va permettre de stabiliser le facteur de transcription FOXO1,

qui induit la répression de la transcription de gènes de proliférations cellulaires. Les IP3 vont ensuite rapidement induire le relargage du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique (Su & Jumaa 2003; Baba & Kurosaki 2016). Ce relargage de calcium en intra-cellulaire induit la phosphorylation des facteurs de transcription NFAT, par le complexe calmodulin/calcalcineurine, qui active des gènes pro-différenciation permettant le réarrangement des IgL. L'importance des facteurs NFAT est mise en exergue par le modèle murin transgénique délété pour NFATc1 qui présente des défauts sévères pour la différenciation B (Giampaolo et al. 2019). L'ensemble de la signalisation médiée par BLNK est donc crucial dans la régulation fine de la signalisation permise par le pré-BCR.

Enfin, l'activation du pré-BCR implique également la voie ERK/MAPK. Celle-ci est associée à la répression de la prolifération cellulaire et l'avancée dans la différenciation B (Figure 35). En effet, les modèles murins de délétion inductible pour Erk1 et Erk2 présentent un blocage de la différenciation au stade pré-BII précoce (Yasuda et al. 2008). L'action de la voie ERK/MAPK semble se combiner à celle de BLNK dans un second temps après l'activation du pré-BCR. Elle passe par la répression de la transcription de cyclines telle que Ccnd3 ainsi

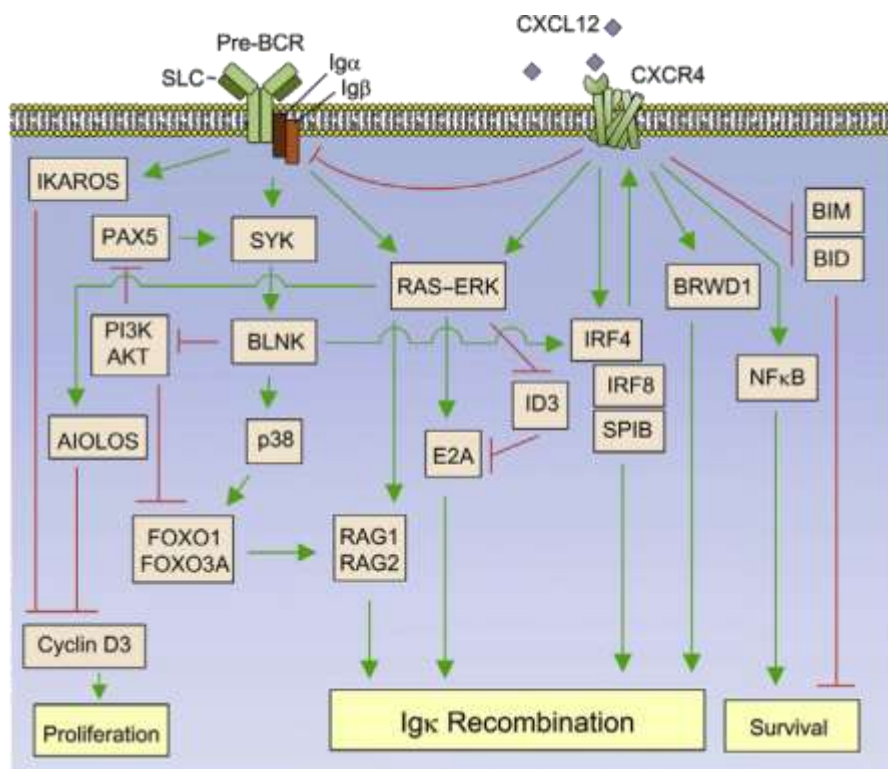


Figure 35 : Schéma des axes de signalisation indépendants et conjoints en aval du pré-BCR et du récepteur CXCR4. (D'après McLean & Mandal 2020).

que par l'augmentation de l'activité du facteur de transcription pro-différenciation E2A (Mandal et al. 2009). Le rôle de la voie ERK dans l'avancée de la différenciation au stade pré-

BII tardif est souligné par son action antagoniste avec les voies de signalisation JAK3/STAT5 et PI3K/AKT/mTOR. En effet, ERK est décrit comme phosphorylant Foxo1 pour induire sa translocation dans le noyau (Asada et al. 2007) alors que AKT le cible pour induire sa dégradation. Aussi, STAT5 et les facteurs de transcription pro-différenciation compétitionnent pour les mêmes cibles transcriptionnelles mais les régulent de manière opposée (Katerndahl et al. 2017), ce qui souligne la nécessité de la répression de STAT5 pour l'avancée dans la lymphopoïèse. L'activité de la voie ERK/MAPK est aussi reportée dans les cellules pré-BII tardives, ce qui suggère qu'une autre signalisation permet son maintien après la fin du signal induit par le pré-BCR. Ces observations ont conduit à la découverte récente de l'implication du récepteur CXCR4 dans la différenciation B.

#### *II.2.D.c Signalisation moléculaire induite par le Cxcr4 :*

##### **1) Signal de différenciation cellulaire**

Le récepteur CXCR4 a pour ligand la chimiokine CXCL12. Il est décrit comme régulant la mobilisation des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse vers les autres tissus. Il est exprimé du stade pré-proB au stade immature-B mais possède un plateau d'expression chez les cellules pré-BII tardives. Cette hausse d'expression semble être en partie dépendante du facteur de transcription IRF4, dont l'activité transcriptionnelle est initiée par le pré-BCR comme vu précédemment. Son action première consiste à supporter la signalisation d'inhibition de la prolifération et d'induction de la différenciation induite par le pré-BCR. En effet, CXCR4 active la voie ERK/MAPK, permettant la persistance du signal après l'internalisation du pré-BCR (Figure 35). Le modèle murin délété pour le récepteur CXCR4 dans la lymphopoïèse B présente un arrêt de la différenciation au stade pré-BII précoce. De plus, l'activation de CXCR4 est décrite comme augmentant l'accessibilité de la chromatine au niveau des locus de facteurs de transcription pro-différenciation tels que IRF4, IRF8, E2A, SPIB, FOXO1 et PAX5 ; tout en diminuant l'accessibilité au locus de STAT5 et MYC (Mandal et al. 2019). A partir du stade pré-BII tardif, la signalisation ERK/MAPK est décrite comme induisant un signal pro-survie par l'intermédiaire du facteur de transcription NFkB (Derudder et al. 2009). Celui-ci réprime des cibles pro-apoptotiques telles que BIM et BAD. Ce signal pro-survie est nécessaire chez les cellules pré-BII tardives au moment où elles initient le réarrangement de leur IgL, mécanisme accompagné de l'induction de dommages à l'ADN lors des recombinaisons.

## 2) Rôle de la niche hématopoïétique pour la disponibilité des ligands

Il est important de détailler ici que le niveau d'exposition des progéniteurs B au CXCL12 joue un rôle crucial dans leur maturation. En effet, dans la moelle osseuse, différentes niches impliquées dans la lymphopoïèse B coexistent. Ces niches se discriminent par la densité et la quantité de CXCL12 et d'IL7 qui s'y trouvent. Il a été récemment démontré qu'il existait une forte hétérogénéité parmi les cellules endothéliales de la niche périvasculaire pour l'expression du CXCL12 et de l'IL7 (Tikhonova et al. 2019). Il est possible de séparer des populations cellulaires de la niche exprimant plus ou moins fortement les gènes codant le CXCL12 et l'IL7. Notamment, ces résultats sont corroborés par des approches de ligation de proximité (PLA) de la répartition du CXCL12 dans la moelle osseuse. Elles indiquent une distribution ubiquitaire de CXCL12 combinée à des enrichissements très localisés autour de certains vaisseaux et au niveau de la niche endostéale (Kunz & Schroeder 2019). Mis ensemble, ces résultats indiquent qu'il existe dans la moelle osseuse différentes micro-niches sécrétant de hautes concentrations de CXCL12 ou d'IL7 et qui sont impliquées dans la régulation des différents stades de la différenciation B (Figure 36). Ce changement de niche semble être permis par la haute capacité de migration des cellules pré-BII précoces. En effet les capacités de migration des cellules pro-B et pré-BI sont faibles comparativement aux cellules pré-BII et plus particulièrement aux cellules pré-BII précoces (Mandal et al. 2019).

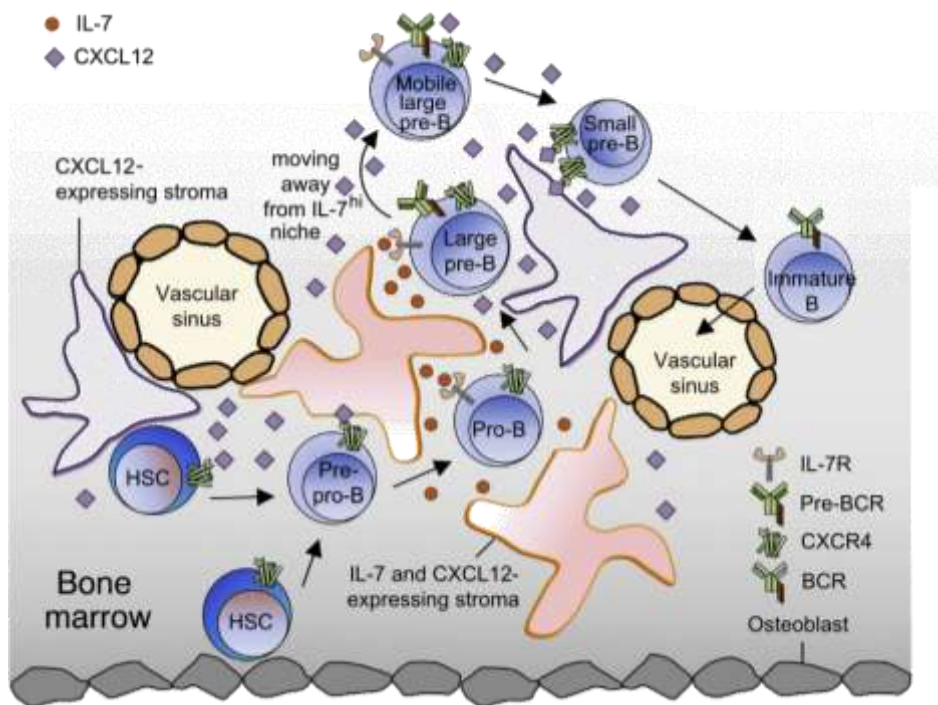


Figure 36 : Schéma de la niche hématopoïétique impliquée dans la lymphopoïèse B ainsi que des gradients d'IL7 et de Cxcl12. (D'après McLean & Mandal 2020).

## II.2.E – Réseau de régulation transcriptionnelle de la différenciation B :

### II.2.E.a Séquentialité de la régulation de l'engagement B

Conjointement à l'avancée dans la lymphopoïèse B, se met en place un réseau de régulation transcriptionnelle complexe. Ce réseau comporte de nombreux facteurs de transcription impliqués dans l'avancement de la maturation B, les réarrangements des immunoglobulines ainsi que la régulation de la prolifération cellulaire. Plusieurs facteurs de transcription sont démontrés comme nécessaires à la mise en place et l'engagement du lignage B. Il s'agit de E2A (Lazorchak et al. 2006), Ikaros (Ikzf1) (Georgopoulos et al. 1994), PU.1 (Spi1) (Arinobu et al. 2007) et Erg (Ng et al. 2020). En effet, les modèles murins délétés pour ces gènes présentent des blocages dans la différenciation B dès le stade CLP /pré-pro-B. Ces facteurs de transcriptions sont nécessaires pour induire l'expression de EBF1 qui initie le passage des cellules au stade pré-proB (Figure 37). En effet, EBF1 est considéré comme le premier facteur de transcription spécifique du lignage B et est donc crucial pour l'engagement définitif dans le lignage B. Notamment, des approches rétrovirales de surexpression de EBF1 dans des CSPHs ont montré que ce facteur était suffisant pour les engager définitivement dans le lignage B (Zhang et al. 2003). Il est intéressant de noter que malgré sa spécificité dans les cellules hématopoïétiques, EBF1 est retrouvé globalement exprimé dans les cellules de la niche hématopoïétique : Ostéo-CAR, Adipo-CAR, fibroblastes, cellules endothéliales des sinusoides ainsi que des artérioles (Baccin et al. 2020). En revanche, la combinatoire de facteur de transcription présente au stade pré-proB permet d'induire spécifiquement l'expression de PAX5, qui lui ne sera exprimé par aucun autre lignage cellulaire de la moelle osseuse.

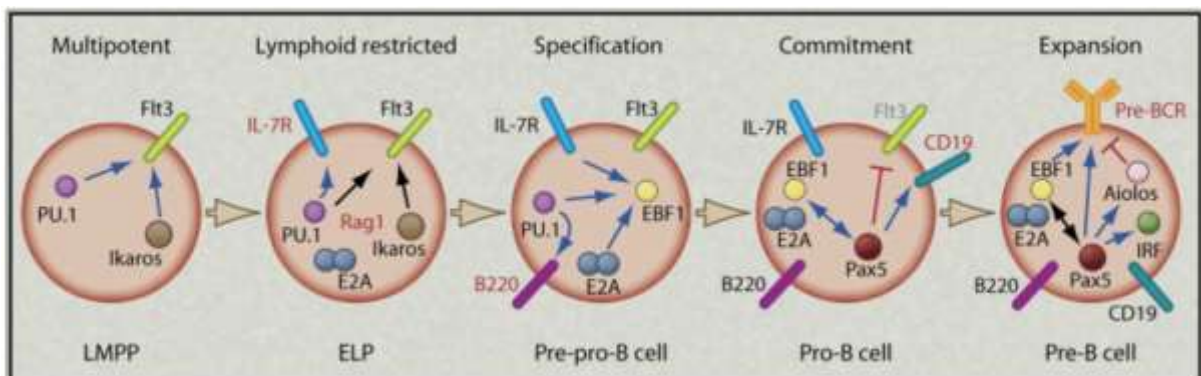


Figure 37 : Modèle multi-étapes de l'implication séquentielle des facteurs de transcription associés au développement B. (D'après Nutt & Kee 2007)

### II.2.E.b Rôle de PAX5 dans la lymphopoïèse B

La régulation transcriptionnelle permise par Pax5 et Ebf1 conduit à l'engagement de manière stable et définitive au stade de différenciation pro-B (fraction B). En effet, il est reporté que PAX5 possède un rôle fortement répresseur pour les programmes transcriptionnels des autres lignages hématopoïétiques, permettant ainsi de maintenir et stabiliser l'engagement dans la différenciation B (Revilla-i-Domingo et al. 2012). PAX5 est responsable de la répression de gènes favorisant la détermination d'autres lignages tels que *Csf1r*, *Ramp1*, *Cd33* pour l'engagement myéloïde (Morrison et al. 1998) et *Notch1* et *Lck* pour l'engagement lymphocytaire T (Souabni et al. 2002). Il est aussi reporté comme réprimant le programme transcriptionnel des progéniteurs immatures non engagés avec des exemples tels que *Flt3* et *Sca1* (Holmes et al. 2006). Dans un même temps, PAX5 induit l'activation transcriptionnelle de certains gènes cibles tels que *Cd19* (Kozmik et al. 1992), *CD79a* et *Blnk* (Schebesta et al. 2002), que l'on a vu précédemment comme critiques pour l'induction du signal depuis le pré-BCR.

Il est intéressant de noter que l'expression et l'activité de PAX5 sont variables durant la différenciation B. Il est par exemple reporté que son expression est plus importante aux stades pré-BII et immature B comparativement aux stades pro-B et pré-BI (Mehtonen et al. 2020). Au stade pré-BII tardive, PAX5 participe à un réseau de facteurs de transcription comprenant SpiB, Aiolos, E2A, Ikaros, Lef1, IRF4, IRF8 et FOXO1 qui induit l'arrêt de la prolifération cellulaire et le réarrangement des IgL. Son implication dans ce réseau transcriptionnel est corroborée par des expériences de répression partielle de PAX5 par shRNA qui entraîne un blocage de la différenciation au stade pré-BII précoce (Liu et al. 2014). De plus PAX5 réprime des gènes différents entre le stade pro-B et le stade mature B (Revilla-i-Domingo et al. 2012), où une baisse d'activité répressive est nécessaire pour l'expression de certains gènes importants dans la fonction des cellules matures. Mis ensemble, ces observations suggèrent que PAX5 possède des actions répressives et activatrices variables selon le stade du développement B.

Il semblerait que l'interaction de PAX5 avec les facteurs de transcription disponibles à chaque étape de la différenciation soit responsable de l'hétérogénéité de ses activités. Cependant, la diversité d'action de PAX5 incrimine aussi des mécanismes propres à la protéine que je vais détailler dans la suite de ce manuscrit.

### II.2.E.c Structure moléculaire du facteur de transcription PAX5

PAX5 est un facteur de transcription à « PAired boX domain ». Ce type de domaine de liaison à l'ADN est partagé par l'ensemble des 9 facteurs de cette famille (Pax1 à Pax9). D'autres domaines fonctionnels de la protéines PAX5 sont caractérisés. Ils incluent un signal de localisation nucléaire (NLS), un domaine octapeptide, un homéodomaine, ainsi qu'une région servant à la régulation transcriptionnelle (Figure 38). Cette dernière est séparée en un domaine de transactivation et d'inhibition transcriptionnelle. L'ensemble de ces domaines est fortement conservé entre l'Homme et la souris où l'on reporte un degré d'homologie supérieur à 95%. Le gène *PAX5* est composé de 10 exons codant une protéine de 391 acides aminés (Homme et Souris). PAX5 est le seul facteur PAX exprimé dans le processus de différenciation hématopoïétique.

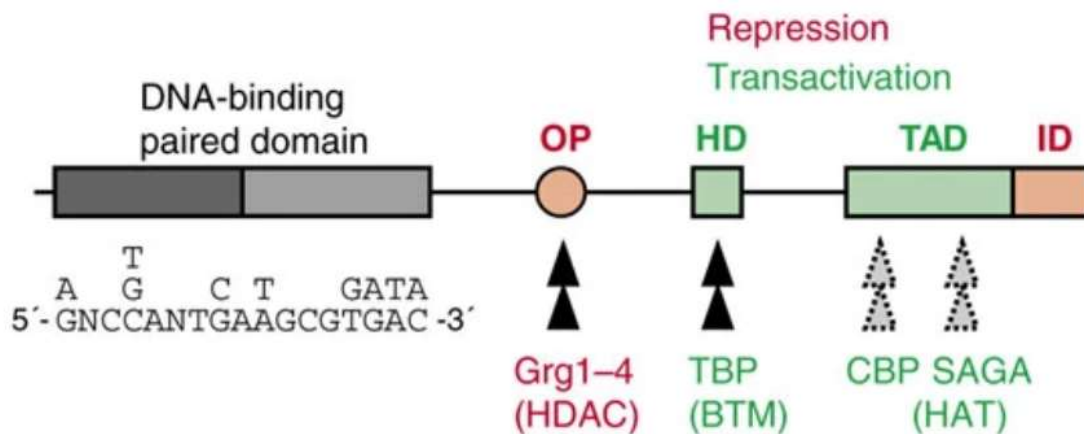


Figure 38 : Schéma structurel de la protéine PAX5 et de ses différents domaines caractérisés. (D'après Medvedovic et al. 2011)

Le domaine PAIRED est composé de 128 acides aminés capables de se lier à l'ADN. Plus précisément, l'analyse en cristallographie de ce domaine a démontré qu'il présentait une structure bipartite PAI et RED. Ces deux sous-domaines se différencient par la présence de deux feuilletts beta en plus des 3 hélices alpha sur le domaine PAI comparativement au domaine RED. Chaque sous-domaine est capable d'interagir seul avec une séquence consensus d'ADN comme l'indique des expériences utilisant des protéines PAX5 tronquées pour le domaine PAIRED (Czerny et al. 1993). Bien que la séquence consensus minimale qu'ils reconnaissent est proche, le reste de la séquence reconnue peut être très diverse, ce qui aboutit à un motif d'interaction avec l'ADN largement dégénéré. C'est pourquoi, les sites de liaison de Pax5 sur l'ADN peuvent s'écarter considérablement de la séquence consensus. De plus, il est reporté que le domaine apparié PAI de Pax5 est suffisant pour induire la transcription (Nutt et al. 1998). Ces spécificités suggèrent que les domaines PAI et RED sont capables de réguler des ensembles

de gènes différents. En effet, des exemples de régulations différentiels suivant la partie du motif lié à l'ADN d'un facteur de transcription sont par exemple décrit pour PU.1 (Taylor et al. 2022).

#### *II.2.E.d Cofacteurs de régulations de PAX5*

Comme nous l'avons vu précédemment, PAX5 possède un rôle double permettant l'activation ou la répression de cibles transcriptionnelles. C'est le recrutement de protéines co-activatrices ou co-inhibitrices qui permet à PAX5 de réguler différentiellement ses cibles. Ces recrutements sont dépendants des domaines non PAIRED, où certains sont plus associés à une activité de répression et d'autres d'activation transcriptionnelle (Figure 39). Des expériences de spectrométrie de masse démontrent que PAX5 recrute des complexes de remodelage de la chromatine, de méthylation, d'acétylation ou de déacétylation des histones ainsi que des composants du complexe d'initiation de la transcription (McManus et al. 2011). Le complexe d'histone transférase CBP/P300 semble notamment jouer un rôle important dans l'induction de l'expression des cibles transcriptionnelles de PAX5 (He et al. 2011). C'est aussi le cas du complexe Swi/Snf qui augmente l'accessibilité à la chromatine des cibles de PAX5 par l'action des protéines Brg1 (Barlev et al. 2003; McManus et al. 2011) et Brm (Gao et al. 2009). En ce qui concerne les co-facteurs responsables de la répression transcriptionnelle induite par PAX5, elles ne sont pas dépendantes des complexes polycomb de tri-méthylation répressive de l'ADN (PRC2) mais utilise des mécanismes plus spécifiques passant par l'action des complexes nCoR1 et NurD/Mi-2b. En effet, NurD/Mi-2B est décrit comme ayant un rôle opposé à celui du complexe Swi/snf pour les cibles transcriptionnelles de PAX5. C'est notamment le cas pour certaines cibles canoniques de PAX5 tel que le Cd79a (Gao et al. 2009). Plus récemment, le rôle de Mi-2B dans la différenciation B a été adressé par l'équipe de Georgopoulos. Les résultats indiquent qu'en absence de Mi-2B, la différenciation B est bloquée au stade pré-BII précoce (Yoshida et al. 2019). Ce blocage précise l'action de complexe de Mi-2B qui d'une part permet la répression des gènes de différenciation non B et d'autre part coordonne l'activation des effecteurs des voies liées à la survie et à la prolifération cellulaire (Il7r et Pi3K Akt mTOR).



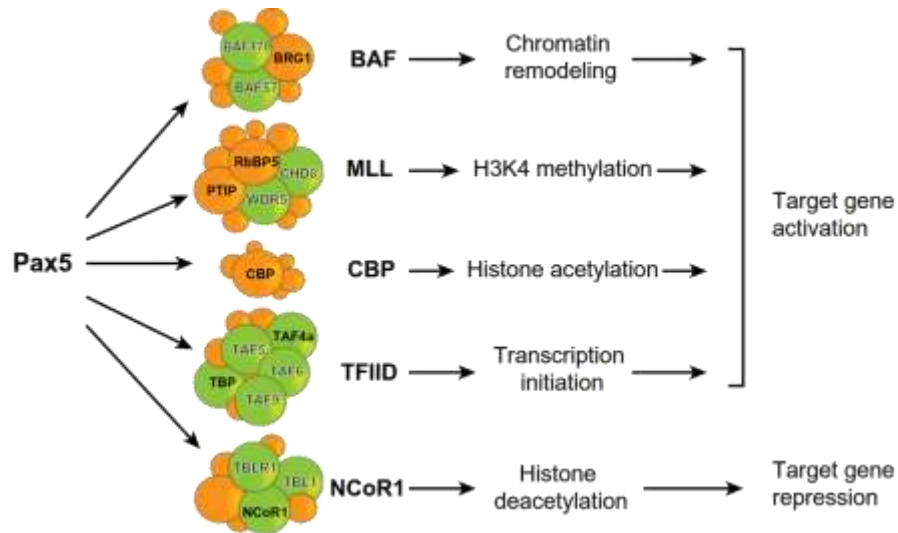


Figure 39 : Schéma des différents complexes de régulation transcriptionnelle recrutés par PAX5. Les noms de protéines grisés correspondent aux protéines identifiées par spectrométrie de masse et ceux en gras par immunoprécipitation. (D'après [Medvedovic et al. 2011](#))

### III/ Les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques B

#### III.1 - Informations cliniques de la pathologie

##### III.1.A - Généralités

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) représentent le cancer pédiatrique le plus fréquent totalisant environ 25% de l'ensemble des cancers de l'enfant de moins de 15 ans. Elles peuvent soit atteindre le lignage des lymphocytes B (85%) soit celui des lymphocytes T (15%). Elles sont définies comme une pathologie multi-étapes, caractérisée par l'acquisition successive d'altérations génétiques. Ces altérations génétiques ont plusieurs conséquences, tout d'abord le blocage de la différenciation d'un progéniteur B suivi d'une prolifération incontrôlée des cellules. L'identité des premières altérations génétiques permet de définir le sous-type oncogénique de la leucémie. Malgré que les LAL arrivent dans plus de 80% des cas chez l'enfant de moins de 15 ans, cette pathologie est aussi rapportée chez l'adulte.

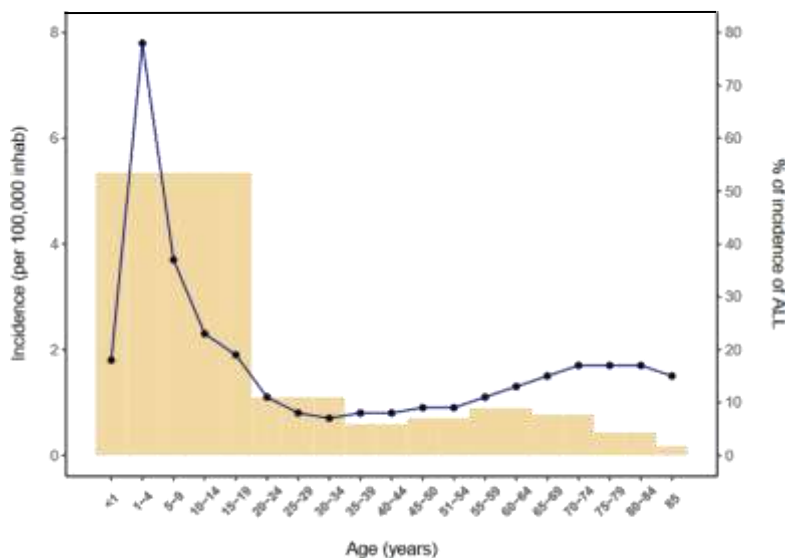


Figure 40 : Incidence globale des LAL en fonction de l'âge représentée en fréquence/100 000 habitants. (D'après la database SEER)

L'incidence des LAL varie en fonction de l'âge (Figure 40). Deux pics d'incidence sont décrits, le premier se déroule entre 2 et 5 ans et le second débute après 50 ans. L'incidence globale des LAL-B n'a que peu variée ces dernières années avec entre 15 à 20 cas pour un million, correspondant à environ 800 à 900 cas par an en France. Les LAL-B sont traitées actuellement à l'aide d'une combinaison de chimiothérapies, des agents chimiques particulièrement efficaces pour éradiquer les cellules les plus prolifératives. Le schéma thérapeutique se décompose en une phase d'induction de 4 à 6 semaines avec des agents de chimiothérapie tels que la Vincristine, le Methotrexate, la Doxorubicine ainsi que des

glucocorticoïdes comme la Dexaméthasone. Cette phase a pour objectif d'arriver à la rémission chez le patient, si celui-ci est répondeur au traitement. Cette polychimiothérapie peut être combinée à une allogreffe de CSHs, permettant ainsi de soutenir l'émergence d'une nouvelle hématopoïèse saine chez le patient, et compétitionnant avec les cellules leucémiques résiduelles. S'en suit une phase de consolidation s'étalant sur 6 à 8 mois afin de préserver la rémission obtenue par la thérapie en induction. Enfin, un traitement d'entretien de moindre intensité est utilisé jusqu'à 2 ans après le début du traitement.

Il est important de spécifier qu'actuellement, la stratégie thérapeutique ne varie que peu en fonction du diagnostic moléculaire mais que l'âge du patient est pris en compte afin d'affiner la dose de polychimiothérapie. En effet, les patients âgés ont une tolérance plus faible que les patients pédiatriques face à la chimiothérapie et cela nécessite donc un ajustement de dose. Chez les patients pédiatriques, l'utilisation des fortes doses de polychimiothérapie a permis une augmentation considérable de la survie globale depuis le début des années 60. La survie globale dans les pays développés est passée de 10% en 1962, à plus de 90% en 2017 (Figure 41). Cependant, la polychimiothérapie est associée à une toxicité pouvant persister toute la vie de l'individu avec des effets secondaires tels que des anomalies endocriniennes, une cardiotoxicité, le développement de tumeurs malignes chimio-induites ainsi que des problèmes de fertilité. De plus, le pronostic de survie globale est plus péjoratif chez les patients âgés de plus de 40 ans, ou seulement 50% survivent après 5 ans (Roberts 2018). Cela est lié à leurs rechutes plus fréquentes qui concernent entre 40 et 75% des patients adultes selon les pays (Thomas et al. 2004; Kantarjian et al. 2004; Rowe et al. 2005).

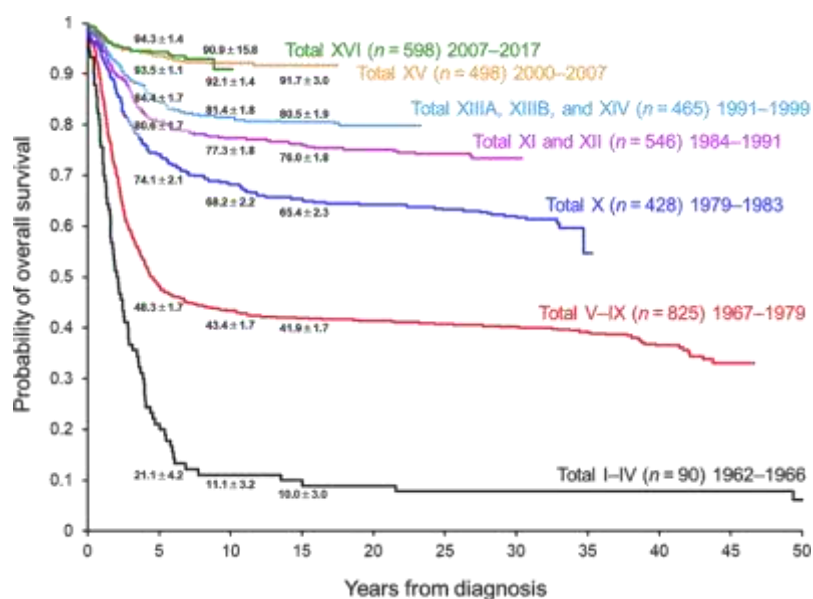


Figure 41 : Evolution de la survie globale des enfants de moins de 15 ans atteints de LAL-B inclue dans des essais cliniques de 1962 à 2017. (D'après Inaba & Mullighan 2020)

### III.1.B – Caractérisation des LAL-B

#### III.1.B.a Caractérisation phénotypique

##### 1) Identifier le stade développemental de la leucémie

La caractérisation phénotypique des cellules leucémiques peut tout d'abord permettre de connaître le stade de différenciation dans lequel la cellule est bloquée. Pour cela, des approches de cytométrie en flux sont utilisées afin de quantifier les marqueurs CD19, CD22, CD20, CD34 et CD10 à la surface des cellules, ainsi que le CD79a, les IgH et IgL en intracellulaire. En Europe, le consortium EGIL utilise ces marqueurs afin de classer les LAL-B en 4 groupes : les pro-B ALL (CD34<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD79a<sup>+</sup>), les B-ALL communes (CD10<sup>+</sup>), les pré-B ALL ( $\epsilon\gamma\mu$ ) et les immatures/matures B-ALL ( $\delta$ IgH) (Bene et al. 1995). Il est important de noter ici que les appellations pour chaque stade de différenciation ne sont pas comparables à ceux définis plus tôt dans ce manuscrit. Les études ayant permis ces classifications n'étant pas actualisées au niveau des connaissances récentes du domaine (comparativement par exemple à l'étude de Nolan décrit plus tôt). En clinique, l'utilisation de ces marqueurs phénotypiques permet essentiellement de discriminer les leucémies aiguës lymphoïdes B, T et myéloïdes afin d'orienter le traitement. La classification EGIL des LAL-B n'est cependant pas utilisée en clinique pour préciser le traitement car ce niveau de phénotypage n'est que peu corrélé avec le pronostic des patients.

Cependant, d'autres travaux réalisés par l'équipe de Nolan prouvent que les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation B (pathologique) peuvent être corrélables avec le pronostic des patients. Pour cela, l'équipe a quantifié simultanément 35 protéines, incluant marqueurs de surface et protéines phosphorylées, sur une cohorte de patients de LAL-B (Good et al. 2018). Couplée à une approche de « machine learning », cette étude a permis de classer chaque leucémie dans son stade de différenciation le plus proche (Figure 42). Ce travail souligne notamment l'importance de la signalisation associée à l'externalisation du pré-BCR dans la leucémogénèse et la rechute de la pathologie. En effet, l'étude indique que la présence (1) de progéniteurs B avec une signalisation mTOR suractivée ou bien (2) de progéniteurs B avec une signalisation pré-BCR pro-différenciation non efficace est prédictive de la rechute dès le diagnostic. Ces résultats sont corroborés par d'autres études qui indiquent une plus haute susceptibilité à la transformation leucémique lors du switch de signalisation entre le signal JAK/STAT et du pré-BCR (Swaminathan et al. 2015). Leur modèle se dénomme « prédicteur de rechute dépendant du développement » (DDPR) et se combine efficacement avec

l'évaluation des risques relative à la classification NCI Rome (Smith et al. 1996) ou à la quantification de la maladie minimale résiduelle (MRD).

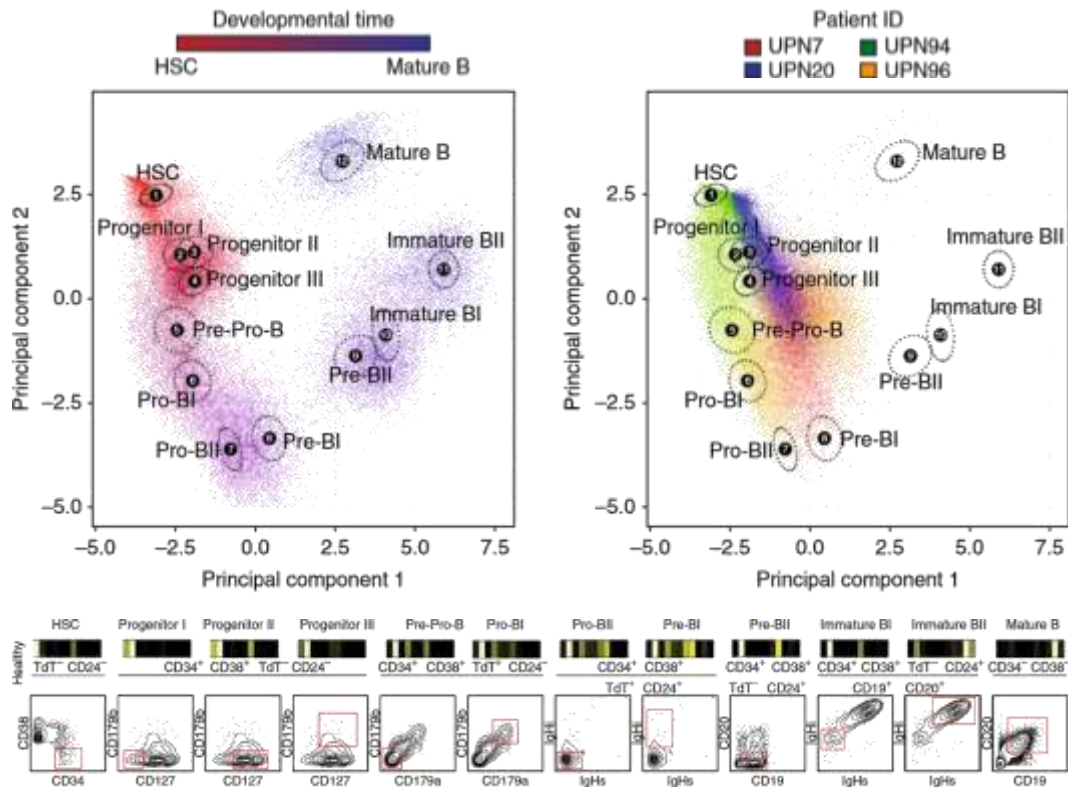


Figure 42 : Figure représentative de l'avancée dans la différenciation B permise par les 35 marqueurs utilisés dans l'étude pour une moelle normale (*Panel haut gauche*) comparativement à 4 moelles de patients ayant développé une LAL-B (*Panel haut droit*). Stratégie de fenêtrage permettant de définir les différents stades de différenciation utilisé dans l'étude (*Panel bas*). (D'après Good et al. 2018)

## 2) Identifier les marqueurs aberrants de la leucémie

La caractérisation phénotypique peut aussi permettre de discriminer spécifiquement des cellules leucémiques des cellules normales. Ce type de stratégie est utilisé dans les approches de MRD afin de prédire la rechute. Cette approche a été utilisée à l'origine pour le suivi des patients sous rémission afin de détecter une potentielle résurgence de la leucémie. L'objectif d'un marquage de MRD n'est donc pas de replacer les cellules leucémiques dans le processus de différenciation normale, mais de discriminer les marqueurs qui sont les plus spécifiques du contexte pathologique. Pour cela, on identifie l'expression, le niveau d'expression, ou la co-expression aberrante de marqueurs sur les cellules leucémiques. La MRD de la moelle osseuse est démontrée comme un bon marqueur prédictif de l'issue clinique des LAL-B pédiatriques (Borowitz et al. 2008) et adultes (Ravandi et al. 2016). En effet, de nombreuses études ont montré qu'un haut niveau de MRD à la fin de la thérapie d'induction et/ou de la phase de consolidation était associé à un risque plus élevé de développer une rechute à court ou long

terme (Saygin et al. 2022). Depuis ces études, la quantification de la MRD est utilisée dans la plupart des protocoles cliniques de traitement de LAL-B. Il est important de préciser que le suivi de marqueur phénotypique par cytométrie en flux n'est pas la seule stratégie utilisée afin de quantifier la MRD chez le patient. En effet, des marqueurs moléculaires sont également suivis tel que des gènes de fusion par RT-qPCR ainsi que les réarrangements IG/TR V(D)J par séquençage de nouvelle génération (NGS) (Saygin et al. 2022).

En Europe, le consortium Euroflow s'est basé sur plusieurs études préexistantes afin de standardiser des panels d'anticorps permettant d'identifier la MRD (van Dongen et al. 2012; Theunissen et al. 2017). On y retrouve les anticorps reconnaissant les protéines CD24, CD123, CD21, CD81, CD58, CD73 et CD304. Il est intéressant de spécifier que les marqueurs discriminant la MRD sont des protéines d'immuno-modulations, des co-régulateurs de signalisation clés pour la différenciation B, des récepteurs permettant d'utiliser des cytokines non impliquées dans la différenciation B, ainsi que des protéines d'adhésion permettant l'indépendance des blastes avec la niche hématopoïétique. Le CD73 et le CD304 sont parmi les marqueurs phénotypiques les plus différenciellement exprimés de façon stable avec les progéniteurs B normaux, aussi appelés hématogones, (20% et 40% respectivement). Le CD73, aussi connu sous le nom de NT5E, est une protéine membranaire permettant d'avoir une activité nucléotidase à l'extérieur de la cellule. Le CD304 correspond à la Neuropilin1 et a été incriminé dans les mécanismes de migration des cellules hématopoïétiques. Toutes deux sont normalement exprimées dans les cellules B recirculantes matures et sont démontrées comme participant aux mécanismes d'échappement immunitaire par l'inhibition des molécules des points de contrôles immunitaires (Beavis et al. 2012; Chuckran et al. 2020). Le CD81 est une tetraspanin abondamment exprimée dans l'ensemble des progéniteurs B mais qui se retrouve à un niveau anormalement bas dans plus de 80% des LAL-B (Barrena et al. 2005). Elle semble jouer un rôle important dans la signalisation du pre-BCR / BCR de par son interaction avec le CD19 et leurs actions conjointes dans l'amplification du signal pro-différenciation (Levy 2014). Le CD123 ou IL3RA est normalement exprimé chez les cellules dendritiques mais se retrouve surexprimé dans plusieurs sous type oncogénique de LAL-B dont les LAL-B hyperdiploïdes (Djokic et al. 2009).

Ce dernier exemple met en évidence que les marqueurs de la MRD peuvent être associés avec des sous types oncogéniques particuliers, donnant par la même occasion des indices sur les voies moléculaires dérégulées dans ces LAL-B et sur l'action de leurs oncogènes.

### III.1.B.b Caractérisation Moléculaire

La classification moléculaire des B-ALL débute par la découverte d'évènements de réarrangements ou de modifications chromosomiques dans les cellules leucémiques. En effet, 75% des LAL-B de l'enfant présentent ce type d'altérations regroupant l'aneuploïdie (perte ou gain de matériel génétique) et les réarrangements chromosomiques (modification structurelle du matériel génétique). Ces évènements oncogéniques sont communément détectés par caryotypage (Pui et al. 1990; Secker-Walker et al. 1997) ou par technique d'hybridation de sondes fluorescentes *in situ* (FISH) (Markovic et al. 2000; Kolomietz et al. 2001). Plus récemment, l'utilisation d'approches en génome entier et en transcriptomique ont permis de préciser ces sous-types ainsi que de caractériser l'ensemble de l'hétérogénéité des altérations oncogéniques des LAL-B (Brady et al. 2022). Ces approches ont permis à ce jour de définir 23 sous-types oncogéniques que je vais introduire par la suite de façon non exhaustive. Les sous-types oncogéniques des LAL-B se différencient par (1) l'identité de la première altération, par (2) l'âge moyen des patients, par (3) la complexité du paysage mutationnelle et enfin par (4) le type de mécanisme moléculaire induisant l'altération (discriminé par une signature COSMIC spécifique) (Figure 43).

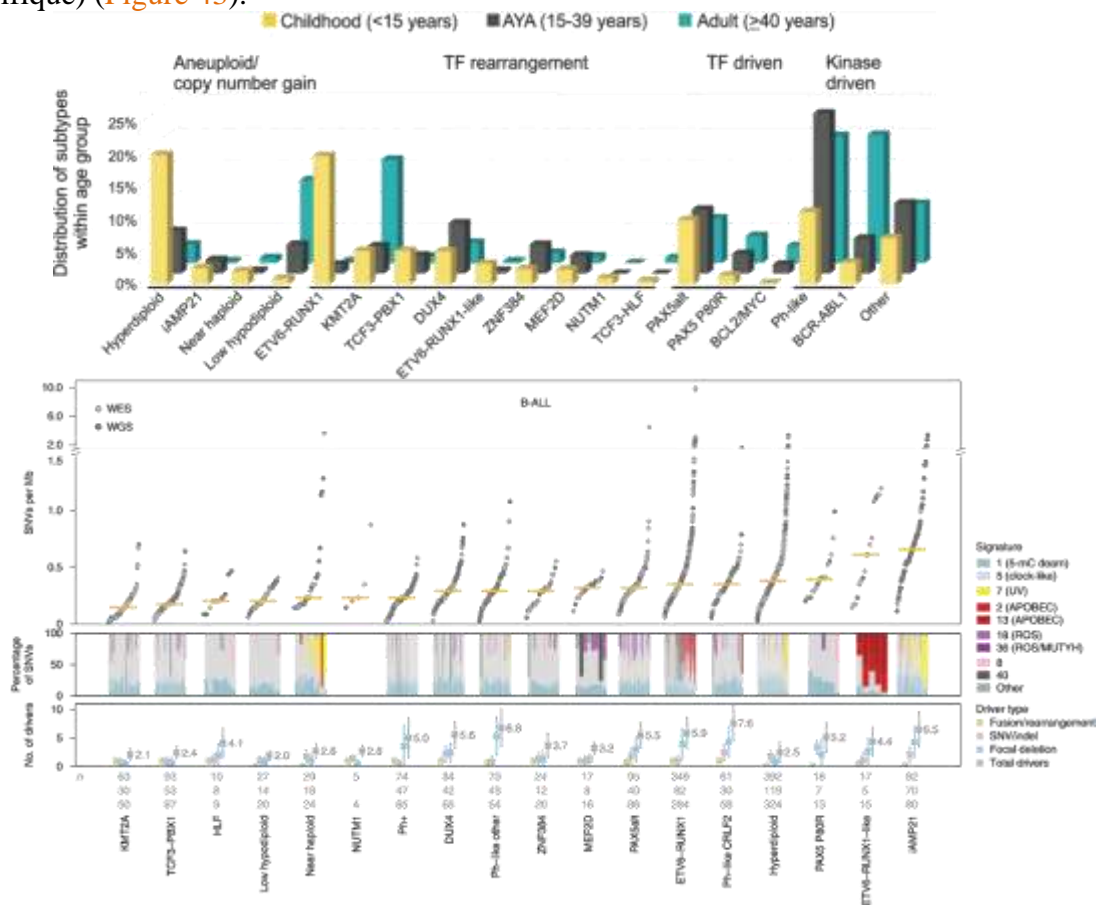


Figure 43 : Distribution des différents sous types oncogéniques des LAL-B en fonction de l'âge des patients (*Panel haut*). Représentation du nombre de SNV par mégabase, de la signature COSMIC associée, ainsi que du nombre d'altérations associées à chaque sous type (*Panel bas*). (D'après Brady et al. 2022).

## Hyperdiploïdes

Il s'agit du sous-type oncogénique le plus fréquent, retrouvé dans plus de 30% des cas de LAL-B et majoritairement chez l'enfant (Moorman et al. 2010). Lors de la division cellulaire, une mauvaise ségrégation des chromosomes peut aboutir à une séparation imparfaite du matériel génétique dans les deux cellules filles et donc à une accumulation anormale de chromosomes. Dans les LAL-B, il s'agit d'un gain non aléatoire concernant les chromosomes X, 4, 6, 10, 14, 17 et 21. Ce sous-type oncogénique est identifié spécifiquement comme ayant un index ADN de plus de 1,16 où les blastes possèdent un nombre de chromosomes totaux variant entre 51 et 67 (Williams et al. 1982). La forte hétérogénéité des événements oncogéniques aboutissant à la pathologie dans les LAL-B hyperdiploïdes rend difficile la compréhension exacte de sa leucémogénèse. De plus, l'ensemble de ces gains de matériel ne semble pas tout à fait équivalent. En effet, bien que ce sous-type oncogénique soit de bon pronostic, une stratification des risques de rechutes selon le type de trisomie peut être réalisée (Schultz et al. 2007). Son bon pronostic s'explique en partie par la forte sensibilité de ce type de LAL face au méthotrexate. Il est démontré qu'une accumulation intracellulaire des métabolites de cette chimiothérapie est particulièrement prononcée dans les LAL hyperdiploïdes (Whitehead et al. 1992). Cela semble être lié au haut niveau d'expression du transporteur SLC19A1 décrit comme capable d'importer le méthotrexate en intracellulaire (Wright et al. 2022). SLC19A1 se trouve sur le chromosome 21 qui est très régulièrement dupliqué. L'analyse récente des variants uniques de nucléotides (SNV) par analyse de génome entier (WGS) et d'exome entier (WES) a prouvé que la majorité des gains de chromosomes ont lieu très précocement et de façon synchronisée (84,6%). En effet, la signature mutationnelle induite par les UV est très peu présente dans ce sous type. De plus, l'identité et le nombre des SNV entre chaque triplet de chromosome sont similaires dans la majorité des cas (Brady et al. 2022). Associées à des gains de chromosomes, les LAL-B hyperdiploïdes possèdent également une forte fréquence de mutations de la voie RAS/MAPK pour des gènes tels que *NRAS*, *KRAS* et *PTPN11* (Jerchel et al. 2018).

## BCR-ABL

Les translocations t(9;22)(q34;q11) ou BCR-ABL sont reportées dans des cas de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) mais aussi de LAL-B. Elles sont dénommées LAL Ph<sup>+</sup> et adviennent presque exclusivement chez le patient de plus de 40 ans. Elles sont associées très fréquemment à des délétions d'*IKZF1* qui peuvent être potentiellement combinées à des délétions de *PAX5*. La protéine de fusion aboutit à une activité tyrosine kinase constitutive et



non contrôlée. Il est décrit que l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL transduit fortement la signalisation JAK/STAT, responsable de la leucémogénèse. Les LAL-B Ph<sup>+</sup> sont de mauvais pronostic car elles sont associées à un haut niveau de rechute et une faible réponse aux chimiothérapies. Il est aussi reporté que ces leucémies peuvent rechuter en LAM après traitement. Ce changement de lignage s'explique par le fait que la translocation BCR-ABL semble advenir directement dans une CSPH (Nagel et al. 2017). Corroborant ce constat, d'autres équipes ont montré chez des patients atteints de LAL-B Ph<sup>+</sup>, la translocation était présente dans des lignages non B (Nishiwaki et al. 2020). L'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase, tels que l'imatinib ou le dasatinib, combinée à une chimiothérapie conventionnelle a permis d'améliorer la survie des patients BCR-ABL (Schultz et al. 2014; Shen et al. 2020)

### **ETV6-RUNX1**

Les translocations t(12;21)(p13;q22) ETV6-RUNX1 correspondent à un des sous-types oncogéniques le plus commun chez l'enfant. Il regroupe plus de 25% des cas recensés chez les patients de moins de 18 ans. Les LAL-B ETV6-RUNX1 sont de bon pronostic avec plus de 80% de rémission à long terme (Forestier et al. 2008; Moorman et al. 2010). Les altérations secondaires les plus communément retrouvées dans ce sous-type oncogénique sont des délétions du second allèle de *ETV6*, d'un allèle de *CDKN2A* ou de *PAX5*. Des études indiquent que les altérations secondaires (principalement des délétions) des patients ETV6-RUNX1 semblent liées à l'action d'enzymes de recombinaison (Papaemmanuil et al. 2014). Elles corroborent l'hypothèse que la haute incidence de cette LAL-B chez l'enfant pourrait être liée à l'instabilité génomique induite dans la différenciation B normale par des enzymes telles que Rag1, Rag2 et AID. Les deux facteurs de transcription impliqués dans cette translocation sont des régulateurs essentiels pour le développement hématopoïétique. C'est pourquoi une translocation les concernant perturbe leur programme transcriptionnel et aboutit à la leucémogénèse. Le mode d'action de cette perturbation vient de la répression des gènes normalement activés par RUNX1 (Hiebert et al. 1996). Cette inversion d'activité suggère que la protéine de fusion, et notamment la partie ETV6, recrute des cofacteurs induisant l'inhibition des cibles de Runx1. Plus récemment, il a été démontré que ETV6-RUNX1 compétitionne avec la protéine RUNX1 endogène et induit la répression de gènes liés à la prolifération cellulaire. Cette répression conduit à un état de quiescence au sein des cellules possédant le premier événement ETV6-RUNX1, jusqu'à l'acquisition d'une mutation secondaire pro-proliférative (Wray et al. 2022).

## TCF3-PBX1

Les translocations t(4;11)(q21;q23) TCF3-PBX1 représentent 5% des LAL-B pédiatriques et leur incidence baisse avec l'âge. Bien que les LAL-B TCF3-PBX1 ont initialement été considérées de pronostic intermédiaire, les derniers protocoles de polychimiothérapies combinées à l'allogreffe parviennent à des taux de rémissions complets de plus de 95% (Zhou et al. 2021). Les altérations oncogéniques secondaires associées à TCF3-PBX1 correspondent essentiellement à des délétions de *CDKN2A* et de *PAX5*. TCF3, aussi connu sous le nom de E2A est un facteur de transcription clé dans l'initiation et la progression du programme transcriptionnel B. Il est démontré que la translocation TCF3-PBX1 est capable d'interagir avec RUNX1 et des cofacteurs d'activation transcriptionnelle tel que MED1, afin d'induire un programme transcriptionnel leucémogène (Pi et al. 2020; Lee et al. 2021). Ce dernier correspond à l'activation de gènes impliquant la voie de signalisation pro-proliférative du pré-BCR (Geng et al. 2015). Ces gènes permettent la transduction d'un signal passant par les SRCs kinases ainsi que SYK afin d'activer un signal pro-prolifératif *via* la voie PI3K/AKT/mTOR. L'implication de SYK et des SRC kinases suggère que des thérapies ciblant spécifiquement ces kinases pourraient être utilisées comme alternative de traitement. Des études *in vitro* corroborent la sensibilité des LAL-B TCF3-PBX1 dépendantes du pré-BCR face à ce type de thérapie (Köhler et al. 2016).

## KMT2A

Les translocations KMT2A (ou MLL), sont associées aux LAL les plus fréquentes du nouveau-né de moins de 1 an (>80%). Elles sont aussi retrouvées chez les patients adultes ou un second pic d'incidence est décrit après 50 ans (Britten et al. 2019). Elles sont de très mauvais pronostic et représentent donc actuellement un des plus gros challenges thérapeutiques des LAL-B. Elles sont caractérisées phénotypiquement par une absence du marqueur CD10 et la présence de marqueurs myéloïdes (Burmeister et al. 2009). Les translocations impliquant MLL sont aussi reportées dans les LAM. Malgré quelques mutations de la voie RAS/MAPK (Driessen et al. 2013) et de *PAX5*, les translocations MLL restent peu associées à d'autres altérations oncogéniques. Cela suggère que les translocations MLL pourraient, à elles seules, suffirent à induire la leucémie. La protéine MLL sert normalement de plateforme pour l'assemblage d'un complexe protéique permettant la méthylation (H3K4<sup>me3</sup>) et l'acétylation des histones. Ce complexe joue un rôle majeur dans la modification de l'environnement chromatinien permettant d'activer la transcription des gènes. Le recombinaison de MLL est particulièrement complexe, avec plus d'une centaine de partenaires « *in-frame* » reportés

(Meyer et al. 2018). Les plus communs correspondent à la famille des protéines AF dont AF4, AF9 et AF10, qui sont nécessaires pour l'élongation de l'ARN et donc la transcription. C'est pourquoi les LAL-B MLL sont caractérisées par une modification profonde de leur épigénome (Krivtsov et al. 2008; Bernt et al. 2011) associée à une activation transcriptionnelle ectopique (Neff & Armstrong 2013).

Ce sous-type oncogénique semble être relativement hétérogène entre les patients mais aussi au sein d'un même bulk leucémique. En effet, une hétérogénéité transcriptionnelle est décrite chez les patients où certains présentent une signature de progéniteurs B précoces (pré-proB) et d'autre de progéniteurs plus avancés dans la différenciation (pré-B) (Brady et al. 2022). De plus, il est décrit que les chimiothérapies peuvent induire la sélection d'un phénotype plus immature ou myéloïde. Mis ensemble, ces résultats suggèrent que les translocations MLL sont capables d'induire une transformation leucémique dans différents stades de la différenciation hématopoïétique. Au vu la précocité du développement leucémique, la question de la cellule d'origine des LAL-B MLL interroge depuis longtemps la communauté scientifique. Récemment, des travaux de l'équipe de Behjati indiquent que l'origine de la leucémie chez le nouveau-né proviendrait d'une cellule embryonnaire antérieure à la gastrulation et donc à la spécification hématopoïétique (Khabirova et al. 2022). Cette hypothèse est renforcée par la présence chez les nouveau-nés de la translocation dans les cellules hématopoïétiques n'appartenant pas au lignage B (Hotfilder et al. 2005) et également dans des cellules non-hématopoïétiques (Menendez et al. 2009). Le développement de nouvelles thérapies dans ce sous-type oncogénique s'intéresse en particulier à cibler l'activité de méthylation et d'acétylation de la translocation. L'utilisation d'inhibiteurs de HDAC de classe I (Entinostat, Droxinostat et Mocetinostat) a notamment été démontrée comme inhibant spécifiquement l'action de MLL-AF4 tout en maintenant l'activité endogène de la protéine MLL normale *in vitro* (Ahmad et al. 2014).

### **Phi-like**

Depuis 2016, la classification WHO des leucémies aiguës recense les LAL-B Ph-like comme une nouvelle entité à part entière, due à leur mauvais pronostic mais à leur bonne réponse face aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) (Arber et al. 2016). Ce sous-type oncogénique a été défini non pas par la présence d'une altération génétique spécifique mais par la similitude de leur programme transcriptionnel avec les patients porteurs d'une translocation BCR-ABL (Den Boer et al. 2009; Mullighan et al. 2009). Il s'agit d'un sous-type oncogénique retrouvé chez 10% des sujets pédiatriques, chez 28% des sujets adultes et chez 20 % des sujets

âgés. Les altérations génétiques communément retrouvées dans ce sous-type sont des délétions de *IKZF1* et/ou de *PAX5*, associées à des altérations ciblant des tyrosines kinases et des récepteurs cytokiniques activant la voie JAK/STAT. Parmi ces altérations de la voie JAK/STAT, différentes altérations sont recensées. Il s'agit tout d'abord des translocations de *CRLF2* qui sont les plus fréquentes (50% des cas), viennent ensuite les translocations impliquant les kinases ABL (X%), et enfin des translocations d'autres récepteurs tyrosine kinase (*PDGRA*, *FLT3* ...). Il est aussi reporté que les patients transloqués pour *CRLF2* possèdent des mutations récurrentes du gène *JAK2* (Harvey et al. 2010). Les patients atteints de LAL-B Ph-like sont sensibles aux ITKs comme le dasatinib, qui convertit leur profil d'expression génique vers celui d'un sous-type oncogénique de meilleur pronostic (Ding et al. 2021).

### **Autre sous-type oncogéniques rares**

D'autres sous-types oncogéniques moins fréquents sont également décrits telles que les translocations *IGH-DUX4* qui sont souvent associées à des délétions de *ERG*. Les patients qui possèdent l'oncogène primaire *TCF3-HLF* sont reportés comme ayant une forte signalisation anti-apoptotique permise par *BCL2* (Fischer et al. 2015), tandis que ceux qui possèdent l'altération *MEF2D* sont reportés comme ayant une expression élevée de *GATA3* associé à des mutations retrouvés communément dans les LAL-T comme *PHF6* (Ohki et al. 2019). Le sous-type oncogénique impliquant des réarrangements du gène *ZNF384* avec *PBX1* ou *EP300* est peu caractérisé actuellement mais semble être de bon pronostic (Hirabayashi et al. 2017). Les hypodiploïdes sont de mauvais pronostic et sont caractérisés par une perte de chromosomes (Molina et al. 2021). On les sépare communément en trois groupes, les « high-hypodiploid B-ALL » (40-44 chromosomes), les « low-hypodiploid » (30-39 chromosomes) et les « near-haploid B-ALL » (24-29 chromosomes). Les mutations secondaires associées semblent différentes entre ces sous-groupes, avec notamment des mutations de la voie RAS pour les « near-haploid B-ALL » et des mutations de *TP53* pour les « low-hypodiploid ». Enfin, deux équipes ont identifiées récemment un nouveau sous-type oncogénique de mauvais pronostic impliquant deux délétions locales. La première résulte en une translocation *UBTF-ATXN7L3* et la seconde permet le rapprochement d'enhancers du gène *PAN3* des régions promotrices de *CDX2*, ce qui permet la surexpression de *CDX2* (Kimura et al. 2022; Passet et al. 2022). De plus, la surexpression de *Cdx2* dans des modèles transgéniques murins est reportée comme étant suffisante pour aboutir à la transformation en LAM (Vu et al. 2020). Certains patients ne

possèdent aucune altération primaire caractéristique connue et sont regroupés temporairement en tant que « other B-ALL ».

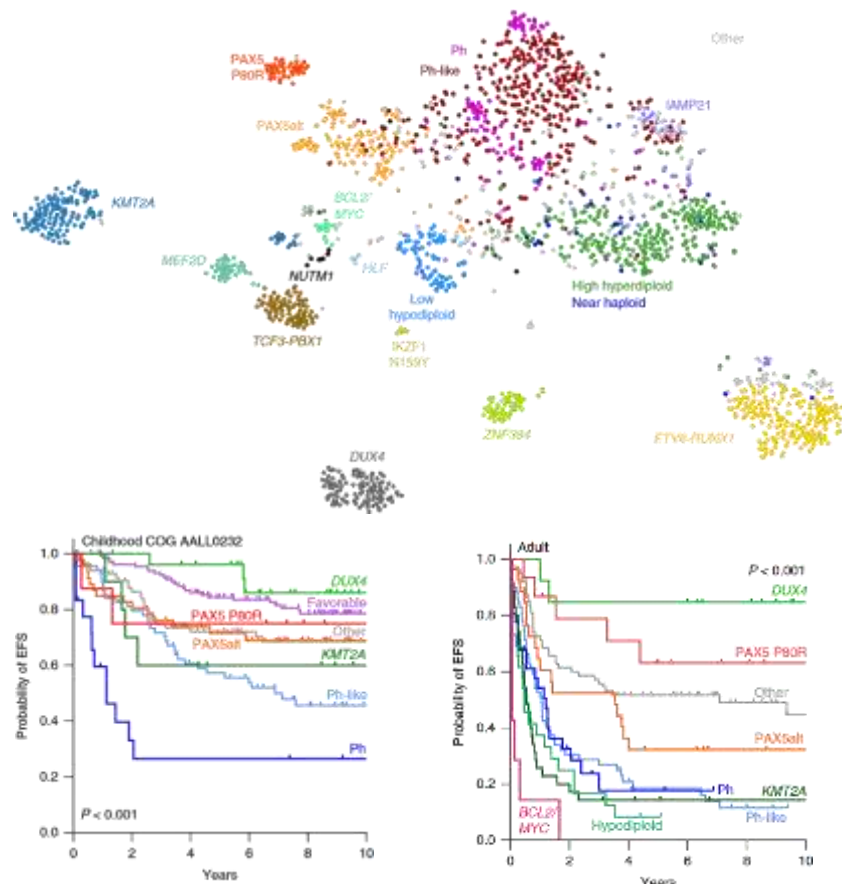


Figure 44 : Réduction dimensionnelle en t-sne du RNA-seq de 1988 patients atteints de LAL-B (*Panel haut*). Courbe de survie sans événement en fonction du sous-type oncogénique pour les patients pédiatriques ou adultes (*Panel bas*). (D'après [Gu et al. 2019](#))

Avec l'avancée des technologies de séquençage et la mise en commun de nombreux échantillons provenant de différents centres hospitaliers, des travaux ont permis une classification des sous-types oncogéniques de LAL-B basée sur leur programme transcriptionnel ([Li et al. 2018](#); [Gu et al. 2019](#)). Les résultats démontrent que l'identité du premier événement oncogénique est suffisante pour définir le paysage transcriptionnel des LAL-B ([Figures 44](#)). De plus, ces études indiquent que le pronostic péjoratif des LAL-B s'explique principalement par l'identité du sous-type oncogénique.

Parmi les différents sous-types, je n'ai pas encore abordé celui des PAX5-alt qui fut défini principalement par son profil d'expression génique distinct. Il s'agit d'un sous type oncogénique où les blastes ne sont porteurs d'aucune altération primaire précédemment évoquée, associée à des mutations et/ou translocation du gène *PAX5*. On considère qu'il s'agit d'altération « gain de fonction » de *PAX5* qui ont pour particularité de posséder une incidence qui varie peu avec l'âge (Figures 43). Les altérations de *PAX5* « perte de fonction », quant à elles, touchent l'intégralité des sous-types oncogéniques et correspondent essentiellement à des délétions. Mis ensemble, ces notions soulignent l'importance de l'altération du gène de *PAX5* dans les processus de leucémogénèse B.

### *III.1.B.c Altérations génétiques de PAX5 dans les LAL-B*

Les altérations de *PAX5* dans les LAL-B sont retrouvées dans approximativement 39% des cas de LAL-B (Mullighan et al. 2007; Familiades et al. 2009). Ces altérations peuvent être de différents types, elles regroupent des délétions qui sont les plus fréquentes (29,7%), mais aussi des mutations (7,2%) et enfin plus rarement des translocations (2%). La nature de ces altérations est directement liée à (1) leur précocité d'acquisition dans la leucémogénèse et (2) leur impact sur la fonction du gène. En effet, les délétions entraînent des pertes de fonction de *PAX5* et sont décrites comme des événements secondaires dans le développement leucémique. Cette hypothèse est corroborée par le fait que les délétions sont toujours associées à la présence d'autres anomalies primaires telles que les translocations BCR-ABL et TCF3-PBX1 (Familiades et al. 2009).

Les mutations de *PAX5* entraînant des pertes ou des gains de fonction sont décrites comme étant des événements secondaires ou initiateurs, respectivement (Figure 45). En effet, dépendamment de la région génique touchée par la mutation, la conséquence sur la fonctionnalité de la protéine diverge. Il est admis que les mutations affectant la moitié N-terminale de *PAX5* sont des altérations initiatrices. Elles comprennent notamment la mutation P80R défini récemment comme un nouveau sous-type oncogénique des LAL-B (Passet et al. 2019). Les mutations affectant la moitié C-ter de *PAX5* sont, quant à elles, considérées comme des pertes de fonction car elles aboutissent souvent à des « frameshifts » entraînant la formation d'une protéine tronquée. Elles peuvent aussi empêcher l'activité transcriptionnelle de la protéine en affectant les domaines de transactivations ou de translocation nucléaire (Fazio et al. 2011).

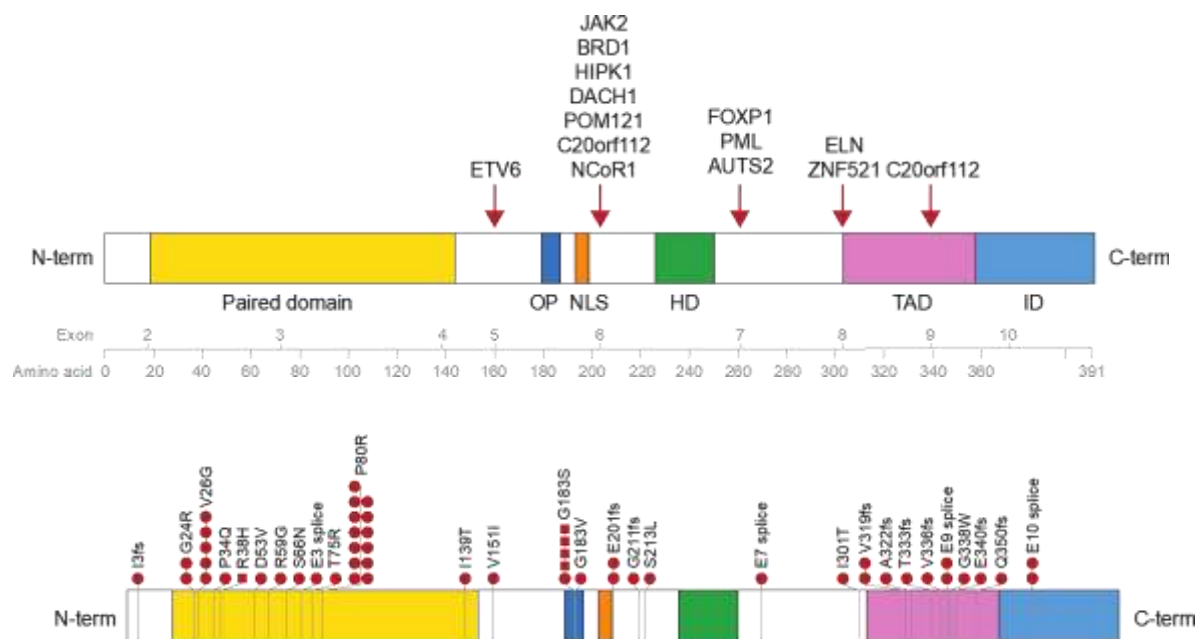


Figure 45 : Schémas représentatifs des mutations du gène *PAX5* et de leur conséquence sur la séquence d'acides d'aminés de la protéine (*Panel haut*). Schéma représentatif des principales translocations du gène *PAX5* et de ses différents partenaires de fusions (*Panel bas*).

Enfin, les translocations de *PAX5* sont des événements initiateurs de la leucémie pouvant impliquer une grande diversité de partenaires de fusion (Figure 45). Actuellement, plus de 50 réarrangements impliquant *PAX5* ont été décrits dont une vingtaine sont capables de former une protéine de fusion. Parmi ses partenaires, il est reporté des gènes codant des protéines aux fonctions diverses telles que des facteurs de transcriptions (ETV6, FOXP1, ZNF521, MLLT3, PML, SOX5) (Cazzaniga et al. 2001; Mullighan et al. 2008; Lee et al. 2012; Fazio et al. 2015), des protéines structurales (ELN, POM121) (Bousquet et al. 2007; Nebral et al. 2009), des kinases (JAK2) (Nebral et al. 2009), des ubiquitines ligases régulatrices du cycle cellulaire (CHFR) (Fazio et al. 2015) ou bien encore des protéines aux fonctions inconnues (C20orf112, AUTS2) (Kawamata et al. 2008; Coyaud et al. 2010). La grande diversité des partenaires de fusion suggère que l'aspect « gain de fonction » est lié à *PAX5* et non aux différents partenaires. Corroborant cette hypothèse, toutes les protéines de fusion impliquant *PAX5* sont capables de se localiser dans le noyau et de se lier à l'ADN. En effet, les deux principales régions « hotspots » décrites comme point de cassure sur le gène *PAX5* se situent après l'exon 5 et 7, préservant ainsi le domaine de liaison à l'ADN. De plus, le programme transcriptionnel des patients transloqués pour *PAX5* est relativement homogène comparativement aux autres sous-types oncogéniques, confortant aussi une similarité d'action. Cependant, la diversité des partenaires de fusion rend la compréhension de l'impact de chaque translocation dans la leucémogénèse complexe.

## III.2 Modèles murins de leucémogénèse B

### III.2.A Etude des voies moléculaires impliquées dans la leucémogénèse

Comme nous l'avons vu jusqu'à maintenant, les défauts entraînant la leucémogénèse concernent les altérations de facteurs de transcription clés pour le lignage B ainsi que des altérations des voies de signalisation RAS/MAPK, du pré-BCR ou JAK/STAT. Chaque sous-type oncogénique utilise une combinaison spécifique de mutations aboutissant à la transformation (Figure 46). Il est intéressant de noter que les altérations dérégulant la voie RAS-MAPK correspondent exclusivement à des événements secondaires. La voie JAK/STAT, quant à elle, peut être altérée par des événements primaires (Ph<sup>+</sup>, CRLF2-X) comme secondaires (JAK3, JAK2, IL7R). Les altérations des facteurs d'identité B peuvent concerner eux aussi des événements primaires (PAX5-alt, TCF3-PBX1, ETV6-RUNX1...) et secondaires (délétions de PAX5, ETV6, IKZF1...). Ces délétions indiquent que la dose de facteur de transcription permettant de stabiliser l'identité du lignage B joue un rôle majeur dans la transformation. En effet, il est reporté dans des modèles murins que la combinaison de différents oncogènes primaires (*TCF3-PBX1*, *BCR-ABL*, *ETV6-RUNX1*) avec la perte d'une dose de PAX5 (PAX5<sup>+/-</sup>) collabore pour induire la transformation leucémique (Duque-Afonso et al. 2015; Martín-Lorenzo et al. 2018; Rodríguez-Hernández et al. 2021). Cependant, bien qu'il s'agisse chez l'Homme d'événements secondaires, les délétions de *PAX5*, *EBF1* ou *IKZF1* induisent une instabilité oncogénique associée à une susceptibilité à développer la leucémie. En effet, une étude récente montre que les souris PAX5<sup>+/-</sup> EBF1<sup>+/-</sup> développent efficacement des LAL-B. Cette transformation s'explique par une baisse d'expression des gènes de la signalisation du pré-BCR combinée à une augmentation de Myc et de la voie de signalisation en aval de l'IL7R dans les progéniteurs B (Ramamoorthy et al. 2020). Dans le cas des délétions de *IKZF1*, il est reporté que le stade pré-BII précoce est enrichi en activité leucémogénique, car ce stade de la différenciation possède un potentiel important pour la reprogrammation d'une signature épithéliale-souche like (Hu et al. 2016).



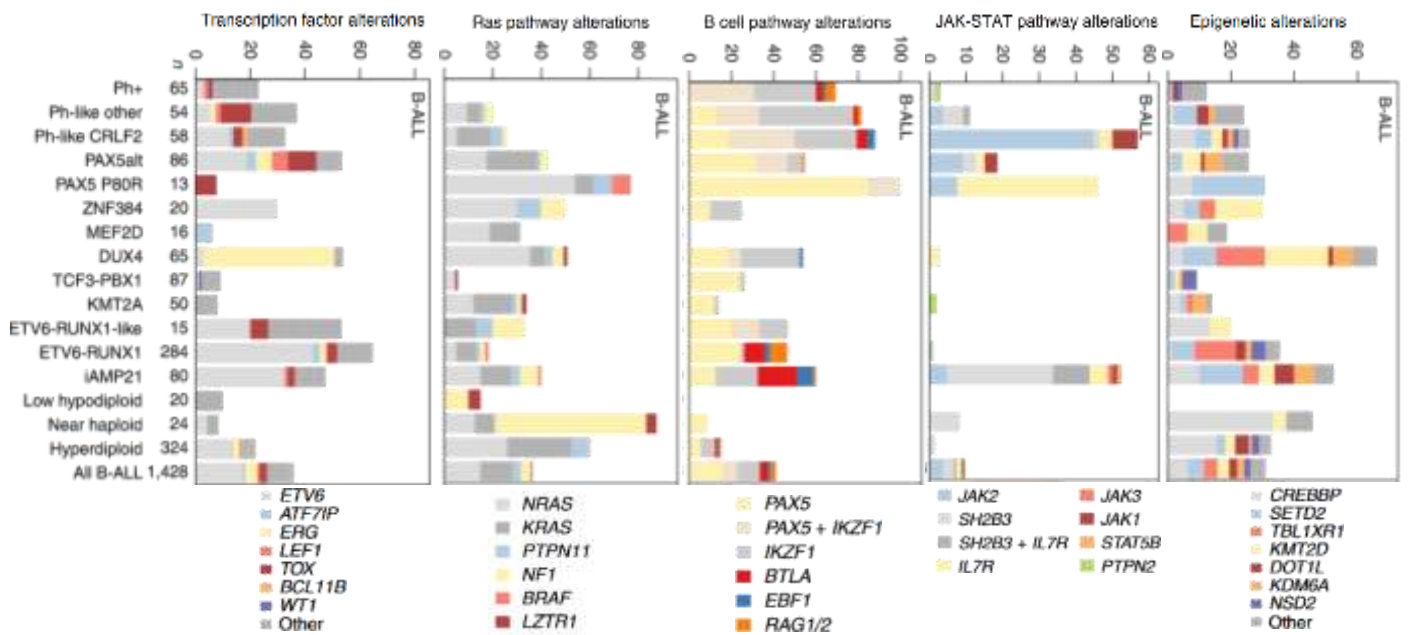


Figure 46 : Répartition des altérations secondaires au sein des différents sous-types oncogéniques des LAL-B. Les altérations sont regroupées suivant les différentes voies moléculaires impactées. (D'après Brady et al. 2022)

L'étude de la leucémogénèse B a aussi été permise par l'étude non pas de l'action d'un oncogène primaire spécifique ou de facteur de transcription, mais d'altération de voie de signalisation. La voie JAK/STAT est décrite comme leucémogénique dans la différenciation B (Malin, McManus & Busslinger 2010; Katerndahl et al. 2017). Les modèles murins constitutivement activés pour STAT5 (STAT5-CA) peuvent développer des LAL-B (Burchill et al. 2003). De plus, les modèles murins de mastocytoses dans lesquels le récepteur kit est constitutivement activé développent des LAL-B, associées à une suractivation de la voie JAK/STAT (Weidemann et al. 2017). Des situations de collaboration leucémogène sont décrites avec la voie JAK-STAT. Notamment, l'utilisation du modèle murin STAT5-CA combiné à un signal inefficace du pré-BCR ( $Blnk^{-/-}$ ,  $Nfkb^{-/-}$ ...) permet d'induire systématiquement la transformation leucémique (Katerndahl et al. 2017). De façon comparable, l'activation de STAT5-CA associée à une diminution de PAX5 et/ou EBF permet une transformation leucémique rapide (Heltemes-Harris et al. 2011; Liu et al. 2014). Les modèles murins constitutivement activés pour STAT5 semblent donc se rapprocher des mécanismes de transformation leucémique observés dans les sous-types oncogéniques  $Ph^+$  et  $Ph\text{-like}^+$ .

### III.2.B – Etude de l'hétérogénéité intra-tumorale

Il est reporté dans différentes études qu'il existe une hétérogénéité de quiescence cellulaire au sein des cellules leucémiques de LAL-B. Cette quiescence cellulaire est corrélée à la résistance aux traitements et associée à la rechute. En effet, des expériences de transplantation de LAL-B dans des souris immuno-déficientes à l'aide d'approche CFSE ont montré que les cellules de LAL-B les plus quiescentes sont comparables fonctionnellement et transcriptionnellement aux cellules leucémiques de la MRD (Ebinger et al. 2016). Les auteurs ont aussi discriminé que la quiescence cellulaire des blastes était dépendante de l'interaction avec le micro-environnement. Cette notion est soulignée par des approches *in vitro* de modélisation de niche hématopoïétique (Ma, Witkowski, et al. 2020). Des conditions de co-culture ont permis aux auteurs de discriminer que certaines cellules leucémiques utilisaient des interactions spécifiques de la niche (CXCR4 et VLA4) afin d'induire un programme de quiescence. De plus, des approches *in vivo* indiquent que les blastes de LAL-B se nichant auprès de cellules adipocytaires survivent plus efficacement aux traitements, par l'induction d'un état de quiescence (Heydt et al. 2021).

Les approches de séquençage à l'échelle unique (Sc RNA-seq) représentent des outils particulièrement puissants pour étudier l'hétérogénéité intra-tumorale. Récemment, ce type d'approche a été utilisée pour comparer des blastes de LAL-B au moment du diagnostic, de la phase résiduelle suivant le traitement (MRD) et de la rechute (Zhang, Wang, et al. 2022). Leurs résultats indiquent que la signalisation de l'hypoxie joue un rôle majeur dans la résistance des cellules de la MRD. De plus ils démontrent que les chimiothérapies associées à des inhibiteurs de HIF représentent une potentielle alternative thérapeutique. La transplantation de LAL-B dans des souris immunodéficientes traitées avec des chimiothérapies permet de modéliser la rechute chez la souris. Ces modèles ont mis en évidence que la diversité des cellules au niveau transcriptionnelle et non génétique était homogénéisée après traitement (Turati et al. 2021). Les auteurs soulignent que l'absence d'une activité transcriptionnelle pro-proliférative induite par les facteurs de transcription MYC et E2F est caractéristique des cellules résistantes. Enfin, l'utilisation de xénogreffe de LAL-B en LDA à grande échelle a permis à l'équipe de John Dick d'identifier des sous clones leucémiques à l'origine de la rechute. Le séquençage en exome complet des xénogreffes obtenues à partir d'échantillon de mêmes patients au diagnostic et à la rechute, ont discriminé des clones au diagnostic similaires à ceux retrouvés à la rechute (Dobson et al. 2020). Ces clones initiateurs de la rechute (dRI) présentent une perte de signature transcriptionnelle d'identité B combiné à un gain de signature de CSHs.

Mis ensemble, ces notions soulignent l'importance de la prise en compte de l'hétérogénéité intra-tumorale pour expliquer la réponse au traitement et les mécanismes liés aux phénomènes de résistances. Cependant, ces approches ne considèrent pas l'hétérogénéité génétique qui existe potentiellement dans la masse leucémique. Pour développer cette notion je vais par la suite introduire le concept de cellule initiatrice de la leucémie.

### **III.3- A la recherche des cellules initiateuses des LAL-B**

#### *III.3.A – Le concept de la cellule souche leucémique*

Dans les LAM, la transplantation de sous-populations de blastes dans des souris immunodéficientes a démontré qu'il existait une hétérogénéité fonctionnelle des cellules leucémiques au sein de la masse tumorale (Lapidot et al. 1994). En effet, les cellules leucémiques sont hétérogènes pour leur capacité à greffer et à induire la leucémie après transplantation (Bonnet & Dick 1997). Ces observations se rapprochent ainsi du modèle hiérarchique de l'hématopoïèse normale, où une CSH génère à elle seule l'ensemble de son tissu. Historiquement, le concept des cellules souches leucémiques (CSLs) repose donc sur l'idée que les cellules leucémiques sont fonctionnellement hétérogènes, suivant un modèle hiérarchique où seule une population de CSLs est capable d'initier et de maintenir à long terme la leucémie. Dans les LAM, les CSLs se rapprochent phénotypiquement des CSHs normales (CD34+ CD38-), suggérant que les altérations oncogéniques surviennent directement dans les cellules les plus souches.

L'application du concept des CSLs dans les LAL-B indique que l'initiation leucémique peut toucher des progéniteurs déjà commis dans la différenciation B. En effet, des expériences de transplantation ont démontré que les cellules leucémiques CD19 positives sont capables de générer la leucémie (Castor et al. 2005; Kong et al. 2008). L'identification des CSLs sur des critères phénotypiques reste cependant controversé, au vu de la plasticité phénotypique et fonctionnelle des cellules blastiques. En effet, des expériences de transplantation de blastes séparant les compartiments CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>Cd38<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> mais aussi CD19<sup>+</sup> et CD19<sup>-</sup> indiquent que tous les compartiments sont capables de générer l'ensemble de l'hétérogénéité phénotypique de départ (Lang et al. 2017; Jiang et al. 2016). Les cellules leucémiques ne semblent donc plus suivre l'évolution normale de l'expression des marqueurs liés à la différenciation. C'est pourquoi il a fallu utiliser d'autres marqueurs d'hétérogénéités telles que les altérations génétiques.

### III.3.B - Diversité clonale des LAL-B : Approche génétique

Avec l'avancée des technologies de séquençage, il a été possible de comparer les profils mutationnels de mêmes patients au diagnostic et à la rechute. Ces analyses démontrent que différentes situations d'évolution et de sélection clonales peuvent expliquer la rechute (Mullighan et al. 2008). Elles peuvent être induite (1) par le même clone que celui retrouvé au diagnostic, (2) par l'évolution clonale du blaste majoritaire retrouvé au diagnostic, (3) par un nouveau clone indépendant et enfin (4) par un clone minoritaire, dilué dans la masse tumorale et possédant une histoire mutationnelle moins complexe (Figure 47). Dans environ la moitié des cas (52%), le clone à l'origine de la rechute est celui qui possède une combinatoire mutationnelle plus simple que celle retrouvée majoritairement au diagnostic. Ces observations indiquent que dans la majorité des cas, les cellules leucémiques de la rechute n'ont pas évolué à partir de cellules de la masse tumorale, mais à partir d'un clone qui présente un nombre plus restreint d'altérations génétiques. Dans l'ensemble, bien que les rechutes puissent donc être produites par un clone prédominant du diagnostic, la majorité d'entre elles proviennent d'un clone minoritaire préexistant et hautement dilué dans la masse tumorale ou de l'évolution d'un clone ancestral pré-leucémique.

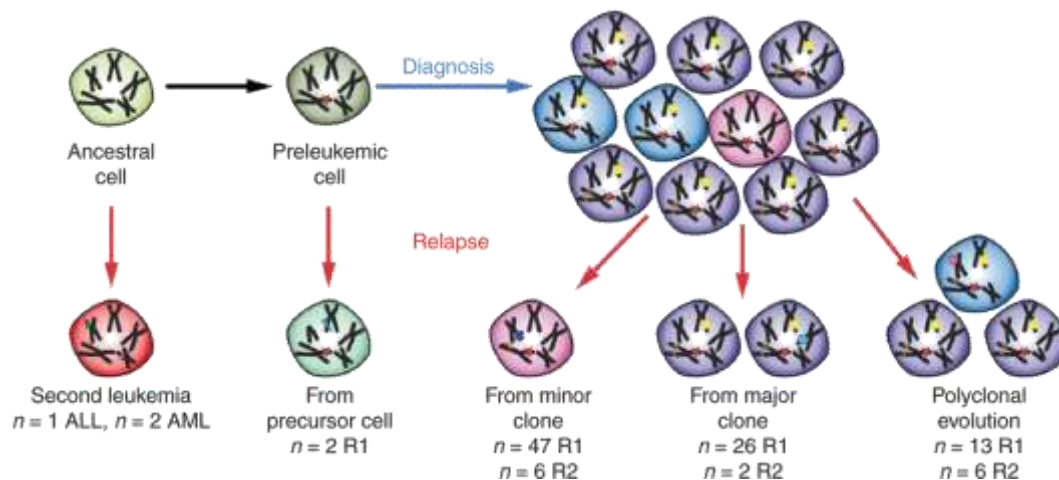


Figure 47 : Evolution de la survie globale des enfants de moins de 15 ans atteints de LAL-B incluse dans des essais cliniques de 1968 à 2009. (D'après Waanders et al. 2020)

### III.3.C - Identification de cellules pré-leucémiques chez l'homme

L'observation d'un état pré-leucémique chez l'homme vient de l'étude de cas clinique rare de jumelles monochorioniques. Après leur naissance, une des deux jumelles développa la leucémie. L'analyse moléculaire de leur test Guthrie démontra que les deux jumelles étaient porteuses de la même translocation *ETV6-RUNX1* à la naissance. Cependant, seule la jumelle leucémique possédait une délétion du second allèle de *ETV6* (Hong et al. 2008). Ils identifièrent

chez la jumelle saine la présence d'une population anormale de cellules CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup>, capables de s'auto-renouveler de façon aberrante. Cette étude permis de valider l'existence des pré-CSLs chez le patient et de les placer au sommet de la hiérarchie leucémique. Elle révèle qu'une translocation chromosomique, en particulier *ETV6-RUNX1*, peut être détectée dans les cellules sanguines avant la naissance, plusieurs années avant le développement de la maladie. Ceci indique que les pré-CSLs contiennent l'altération génétique fondatrice (i.e. la translocation *ETV6-RUNX1*) mais qui n'est pas suffisante pour induire la leucémie à elle seule. Plus tard dans la vie, c'est l'acquisition d'évènements coopérateurs (i.e. la délétion de *ETV6*) qui conduira à la transformation tumorale. L'utilisation de technique de FISH chez des patients leucémiques *ETV6-RUNX1* a confirmé la présence de cellules comportant uniquement la translocation initiale (Anderson et al. 2011). Ces résultats confirment que les pré-CSLs persistent chez le patient au stade leucémique mais sont extrêmement diluées dans la masse tumorale.

Les résultats obtenus sur les jumelles monochorioniques ont motivé différentes équipes à analyser la fréquence d'altérations oncogéniques récurrentes ayant lieu *in utero*. L'étude de sang de cordon de cohorte de plusieurs centaines de nouveau-nés pour les translocations *ETV6-RUNX1* indique qu'entre 1 et 2% (Zuna et al. 2011) des enfants sains sont positifs. Des travaux similaires pour les translocation *TCF3-PBX1* rapportent qu'environ 0,6% des nouveau-nés sont porteurs de l'altération (Hein et al. 2019). Ces proportions étant bien supérieures au taux d'incidence de ces leucémies, ces résultats indiquent que certains évènements oncogéniques adviennent fréquemment en pré-natal, mais n'aboutissent pas tous à une transformation leucémique. Pour l'équipe de Mel Greaves, l'incidence élevée des LAL-B chez l'enfant s'explique directement par le fait que les évènements primaires adviennent *in utero*. La probabilité d'acquérir les mutations additionnelles serait ensuite dépendante de l'environnement de vie de l'individu où des conditions pro-inflammatoires représenteraient un facteur de risque important (Greaves 2018). Ces notions sont corroborées par l'utilisation de modèle de souris *PAX5<sup>+/-</sup>* qui une fois placée dans des environnements pro-inflammatoires vont développer la LAL-B beaucoup plus efficacement (Martín-Lorenzo et al. 2018). Certaines cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL6 sont incriminées dans ce processus leucémogène (Isidro-Hernández et al. 2020). Ces résultats indiquent que les pré-CSLs ne sont pas toutes vouées à transformer et que leur susceptibilité à développer la leucémie est dépendante de leur environnement.

### III.3.D – Définition du modèle multi-étape des LAL-B

Le modèle de leucémogénèse des LAL-B résultant de ces études est le suivant :

- 1) Une première altération génétique initiatrice permet de bloquer la différenciation B et/ou bien d'induire une susceptibilité à acquérir des mutations additionnelles (il s'agit des évènements dit de prédisposition génétique). Ces altérations génétiques sont présentes dans l'ensemble des cellules leucémiques. Comme nous l'avons vu, elles correspondent majoritairement à des translocations chromosomiques (ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1, BCR-ABL, CRLF2-translocations, PAX5-translocations, KMT2A-translocations, IGH-DUX4...) ainsi qu'à certaines mutations ponctuelles (P80R, IKZF1N159Y) et spécifient l'identité du sous type oncogénique de la leucémie. Il est fortement suggéré que ces lésions initiatrices reprogramment des propriétés d'auto-renouvellement à des progéniteurs qui en sont normalement dépourvus. Ce gain fonctionnel jouerait un rôle important dans l'expansion initiale de la population pré-leucémique. La mise en place de cette population et sa maintenance jusqu'à l'acquisition des altérations secondaires correspond à l'étape d'initiation leucémique.
  
- 2) Ensuite, l'accumulation d'altérations secondaires ciblant des gènes impliqués notamment dans la différenciation B, telles que les délétions de *PAX5*, *ETV6* ou *IKZF1* déclenche la transformation leucémique. A cela s'ajoute des évènements secondaires altérant les processus de prolifération cellulaire. Ils peuvent cibler directement des régulateurs du cycle cellulaire telles que les délétions *CDKN2A* et *CDKN2B*, mais aussi des gènes codant pour des protéines de la voie de signalisation RAS (NRAS, KRAS, PTPN11) ou certaines kinases (JAK2/3) impliquées dans la transduction du signal de la voie JAK/STAT. Ainsi, les altérations secondaires coopèrent avec l'altération primaire afin de développer la leucémie en rendant les cellules indépendantes de leur environnement, ce qui leur permet de proliférer de façon incontrôlée et de se propager hors de la moelle osseuse.

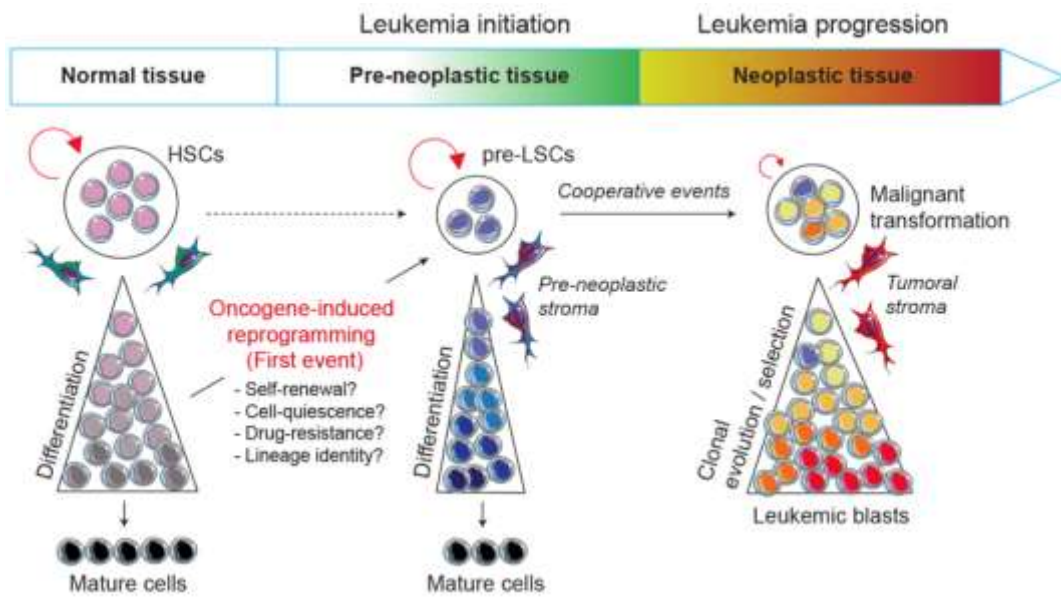


Figure 48 : Schéma du modèle de développement multi-étape de la leucémogénèse dans les LAL-B. (D'après [Fregona et al. 2021](#))

## CONTEXTE ET TRAVAUX DE THESE

Une question importante est l'identification des cellules d'origine de la leucémie. La limite majeure pour leur identification chez l'Homme est leur extrême rareté au sein de la masse tumorale. Grâce à l'utilisation de modèles de souris transgéniques, plusieurs études indiquent que des oncogènes primaires peuvent convertir des progéniteurs hématopoïétiques engagés en pré-CSLs, en leur reprogrammant des propriétés aberrantes de cellules souches normales telles que la quiescence et la fonction d'auto-renouvellement (Duque-Afonso et al. 2015; Tremblay et al. 2018). Ces observations supportent l'idée que la reprogrammation de la propriété d'auto-renouvellement par un oncogène primaire est une étape critique dans l'initiation leucémique et motivent le développement d'une stratégie ciblant les pré-CSLs. L'identification, la caractérisation des pré-CSLs ainsi que le développement de nouvelles thérapies ciblant ces cellules représentent donc un défi d'envergure en recherche fondamentale et translationnelle.

C'est donc dans ce cadre que se sont inscrits mes travaux de master 2 puis de thèse au sein de l'équipe IDGAALD du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT). L'équipe s'intéresse depuis de nombreuses années à l'implication de facteurs de transcription dans la leucémogénèse, en particulier à celle de PAX5 dans les LAL-B (Familiades et al. 2009). En 2007, l'équipe a identifié une nouvelle translocation t(7;9)(q11;p13) récurrente impliquant PAX5 et le gène de l'élastine (ELN), chez des patients atteints de LAL-B (Bousquet et al. 2007). Nous nous sommes donc posé la question si la translocation PAX5-ELN, considérée comme un événement oncogénique primaire, perturbait le développement B normal dans les étapes précoces de la maladie. En effet, les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels PAX5-ELN reprogramment les cellules B, perturbent leur fonction et induisent la transformation leucémique restaient à définir.

Afin de déterminer le potentiel leucémique B de PAX5-ELN, l'équipe a développé un modèle de souris dans lequel la protéine de fusion PAX5-ELN est exprimée spécifiquement dans le lignage B. Ce modèle a été obtenu en insérant la séquence humaine de PAX5-ELN sous le contrôle du promoteur  $\mu$  des chaînes lourdes des immunoglobulines. Les souris exprimant PAX5-ELN développent efficacement la LAL-B avec une pénétrance de 80% à 300 jours et une médiane de survie de 170 jours. De plus, les analyses moléculaires indiquent que les cellules leucémiques sont porteuses de mutations récurrentes affectant des gènes des voies de signalisation JAK/STAT ou RAS/MAPK. Un temps de latence de 3 mois est nécessaire avant l'apparition des premières leucémies et nous donne donc l'opportunité d'explorer la phase précoce de la maladie, avant que les cellules acquièrent des mutations secondaires. Durant mon



stage de master 2, j'ai contribué à la caractérisation de ce modèle en réalisant l'analyse transcriptomique des progéniteurs B pré-leucémiques. Mon travail a permis de démontrer que l'oncogène PAX5-ELN n'induisait pas d'effet dominant négatif sur l'activité de PAX5 endogène. De plus, en comparant nos données avec celle de la littérature, j'ai discriminé une liste de gènes et de voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'initiation leucémique. L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *PNAS* en octobre 2018 que je signe en 2ème auteur ([Jamrog et al. 2018](#)) et qui fait l'objet de l'Annexe 1 de ce manuscrit.

Dans l'ensemble, ce travail indique que le modèle de souris PAX5-ELN récapitule le développement multi-étapes de la LAL-B par l'acquisition d'événements oncogéniques secondaires et permet d'explorer les phases pré-leucémiques qui précèdent la transformation tumorale. En effet, ce modèle ouvre de nouvelles voies d'investigation pour déchiffrer et cibler les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels un oncogène primaire, ici PAX5-ELN, convertit un progéniteur B normal en pré-CSLs. Dans ce contexte, mon travail principal de thèse a consisté, à l'aide de ce modèle, à définir les propriétés biologiques reprogrammées par PAX5-ELN au sein des pré-CSLs. Mes travaux indiquent que PAX5-ELN induit au stade pré-leucémique l'émergence d'une population au phénotype aberrant, associée à la présence de cellules quiescentes. Les expériences fonctionnelles et moléculaires que j'ai réalisées pendant ma thèse montrent que ces cellules pré-leucémiques quiescentes : (i) sont dépourvues de mutations secondaires, (ii) sont bloquées dans la différenciation B associé à l'activation du marqueur Kit et de la voie de signalisation JAK/STAT, (iii) sont résistantes aux agents de chimiothérapies, (iv) réactive de façon partiel un programme de CSPHs et (v) sont le support de l'initiation et de la transformation leucémique. L'ensemble de mon étude indique donc que l'oncogène PAX5-ELN reprogramme des propriétés aberrantes de cellules souches à un progéniteur B au stade pré-leucémique, répondant fonctionnellement à la définition de pré-CSLs. Ce travail fait actuellement l'objet d'un article soumis que je signe en 1er auteur, et que je vous présente dans la partie « résultats du travail de thèse » de ce manuscrit.

En parallèle de ce travail expérimental, nous avons récemment publié une revue de la littérature dans le journal *Cancers* que je signe en 1er auteur ([Fregona et al. 2021](#)) et qui fait l'objet de l'Annexe 2 de ce manuscrit, dans laquelle nous exposons les concepts d'hétérogénéité et de plasticité des cellules leucémiques des patients. Nous discutons également de l'utilisation des modèles de souris transgéniques pour explorer les étapes précoces de la maladie et identifier les mécanismes qui conduisent à l'apparition des pré-CSLs. Enfin, nous décrivons les efforts

actuels visant à découvrir des stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement leurs propriétés aberrantes.

Durant ma thèse, j'ai aussi été impliqué dans différents projets en cours de publication ou actuellement publiés. En effet, notre équipe s'intéresse aux altérations germinales de PAX5 et en particulier à l'altération PAX5-R38H chez les patients et de son implication dans le développement des LAL-B. Dans le cadre de cette étude j'ai réalisé l'analyse des données de transcriptomiques validant la perte de fonction de R38H. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Blood* que je signe en deuxième auteur ([Duployez et al. 2021](#)). J'ai aussi pris part à un projet prochainement publié qui s'intéresse au syndrome de déficience en GATA2. Il s'agit d'une pathologie où les patients possèdent des altérations germinales du gène *GATA2*. Ces patients développent des hémopathies myéloïdes (MDS/LAM familiales) de façon précoce ([Donadieu et al. 2018](#)). Une souris transgénique GATA2 R396Q a été mise en place au sein du laboratoire afin d'étudier finement cette pathologie. J'ai participé à l'élaboration du design expérimental de certaines expériences, à l'analyse des données Omics de cette étude (ATAC-seq et RNA-seq), ainsi qu'à la génération et l'analyse de coupe d'immunofluorescence de foie fœtal et de moelle osseuse de souris GATA2 R396Q.

## RESULTATS

---

## **Cell quiescence and reprogramming are distinctive features of pre-leukemic stem cells in B-cell acute lymphoblastic leukemia**

Vincent Fregona<sup>1</sup>, Manon Bayet<sup>1</sup>, Mathieu Bouttier<sup>1</sup>, Laetitia Largeaud<sup>1,2</sup>, Camille Hamelle<sup>1</sup>, Laura Jamrog<sup>1</sup>, Naïs Prade<sup>1,2</sup>, Stéphanie Lagarde<sup>1,2</sup>, Sylvie Hebrard<sup>1</sup>, Isabelle Luquet<sup>1,2</sup>, Véronique Mansat-De Mas<sup>1,2</sup>, Marie Nolla<sup>3</sup>, Marlène Pasquet<sup>1,3</sup>, Christine Didier<sup>1</sup>, Ahmed Amine Khamlichi<sup>4</sup>, Cyril Broccardo<sup>1</sup>, Éric Delabesse<sup>1,2\*</sup>, Stéphane Mancini<sup>5\*</sup> and Bastien Gerby<sup>1@</sup>.

<sup>1</sup>Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université Toulouse III Paul Sabatier (UPS), 31100 Toulouse, France.

<sup>2</sup>Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse, 31000 Toulouse, France.

<sup>3</sup>Department of Pediatric Hematology, CHU de Toulouse, 31000 Toulouse, France.

<sup>4</sup>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UPS, 31077 Toulouse, France.

<sup>5</sup>Microenvironment, Cell differentiation, immunology and Cancer (MICMAC), Inserm U1236, Rennes.

### **Footnotes**

@, Address correspondence to Bastien Gerby, CRCT INSERM UMR1037, 2 avenue Hubert Curien, Oncopole, CS 53717, F-31037 TOULOUSE CEDEX 1 (FRANCE)

ORCID: 0000-0002-2657-4200

E-mail address: [bastien.gerby@inserm.fr](mailto:bastien.gerby@inserm.fr)

Phone number: 0033 5 82 74 17 61

\*ED and SM contributed equally to this work.

## **Abstract**

The leukemic stem cell concept is well established in B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). However, the question of how a primary oncogene reprograms stem cell-like properties in committed B-cells and leads to a pre-neoplastic population remains unclear. Here, we used the *PAX5::ELN* oncogenic model to demonstrate a causal link between the differentiation blockade, the self-renewal and the emergence of pre-leukemic stem cells (pre-LSCs). Through multi-parametric immunophenotyping, we show that *PAX5::ELN* oncoprotein disrupts the differentiation of pre-leukemic cells by enforcing the *IL7r/JAK-STAT* signaling pathway. This disruption is associated with the induction of rare and quiescent pre-LSCs that sustain the leukemia-initiating activity, as assessed using the *H2B-GFP* model. Integration of transcriptomic and chromatin accessibility data reveals that those quiescent pre-LSCs lose B-cell identity and reactivate an immature molecular program, reminiscent of human B-ALL chemo-resistant cells. Finally, our transcriptional regulatory network (TNR) reveals the transcription factor *EGR1* as a strong candidate to control the quiescence/resistance of *PAX5::ELN* pre-LSCs as well as of blasts from human B-ALL. Collectively, our study sheds new lights on the biological mechanisms underlying the cell-of-origin of leukemia.

## **Running title**

*PAX5::ELN* reprograms B-cell progenitors into quiescent pre-leukemic stem cells.

## **Keywords**

B-cell acute lymphoblastic leukemia; primary oncogenic event; pre-leukemic stem cells; oncogene-induced reprogramming; cell quiescence; self-renewal; leukemia initiation.

## Introduction

Cell quiescence and self-renewal activity are distinctive characteristics of normal stem cells that are lost throughout the differentiation process. Nevertheless, it is established that molecular reprogramming occurring in cancer cells frequently leads to tumor dedifferentiation and the acquisition of stemness features (Bradner et al., 2017). This notion has been exploited to predict the clinical outcome of patients with solid cancers and hematological malignancies (Malta et al., 2018; Ng et al., 2016; Yan et al., 2020) and supports the idea that cellular plasticity, reprogramming and cancer resistance are tightly intertwined. Among hematological malignancies, B-ALL is defined as the most frequent pediatric cancer. Although current chemotherapy is efficient at reducing the tumor load by targeting proliferating and metabolically active leukemic cells, the disease relapse points to the presence of resistant cells that escape treatment (Inaba and Mullighan, 2020). Thus, the biological properties of the cell-of-origin of leukemia including sustained self-renewal activity, cell-quiescence and drug-resistance, can significantly affect leukemia treatment and should be considered in the search for new targeted therapies (Fregona et al., 2021).

The evolution and the dynamic of subclones in B-ALL cells have been fully explored in several works through the comparison of the genetic landscape of paired diagnostic and relapse samples (Dobson et al., 2020; Mullighan et al., 2008; van Delft et al., 2011; Waanders et al., 2020). These studies predicted the existence of an ancestral clone of pre-leukemic stem cells (pre-LSCs) harboring a restricted number of genetic alterations, such as a founding chromosomal translocation, which is not yet transformed but at the apex of the clonal hierarchy. The notion of a multi-step process of B-ALL development have also been gained from studies exploring the leukemia initiation and progression in monozygotic twins (Greaves, 2018; Hong et al., 2008). These approaches demonstrated that a primary chromosomal translocation by itself does not have the capacity to induce the disease, but establishes a pre-leukemic sub-clonal compartment in blood cells many years before the leukemia onset. Recurrent chromosomal translocations have been described in B-ALL and lead to the expression of chimeric fusion proteins. These oncoproteins often harbor domains of transcription factors (e.g., ETV6::RUNX1, TCF3::PBX1, PAX5::ETV6, PAX5::ELN) (Coyaud et al., 2010; Familiades et al., 2009; Mullighan et al., 2007). For instance, the transcription factor PAX5, known to play an important role in the transcriptional regulatory networks of early B-cells, the definitive B-cell commitment and the plasticity of committed B-cells (Cobaleda et al., 2007a; Cobaleda et al., 2007b), was also shown to promote leukemogenesis once translocated in mouse models (Jamrog et al., 2018; Jurado et al., 2022; Smeenk et al., 2017). Thus, it is widely thought that recurrent chromosomal translocations can act as a first oncogenic event in the early steps of B-ALL initiation, though the precise mechanisms at play are yet ill-known.

The development of transgenic mouse models with activated primary oncogenes not only helped to identify the oncogenic collaborators required for the leukemia development but also allowed to identify pre-LSCs in the early steps of the disease. Various studies using *in vivo* models demonstrated that, in both lymphoid and myeloid malignancies, a primary genetic alteration can confer stem cell-like properties to normal committed progenitors and convert them into self-renewing pre-LSCs (Cozzio et al., 2003; Gerby et al., 2014; Huntly et al., 2004; Krivtsov et al., 2006; McCormack et al., 2010; Wojiski et al., 2009). Other studies using T-ALL mouse models showed that pre-LSCs are resistant to chemotherapeutic agents because of their distinctive slow-division rate (Gerby et al., 2016; Tremblay et al., 2018). These findings support the view that self-renewal and cell quiescence are early and obligatory events in leukemia initiation, two specific features of the cell-of-origin, and differ from the propagating activity of fully transformed leukemic blasts. However, how a primary oncogene reprograms committed B-cell progenitors into pre-LSCs with altered self-renewal and survival properties remains to be fully explored (Fregona et al., 2021).

To this end, we took advantage of a genetically engineered mouse model expressing the human PAX5::ELN fusion oncoprotein (Jamrog et al., 2018), recurrently identified in B-ALL patients (Bousquet et al., 2007). PAX5::ELN-expressing mice efficiently develop B-ALL, reproduce accurately the key features of leukemia development including secondary mutations acquired during the multi-step process of human B-ALL, and provides an unrestricted and reproducible access to a pre-LSC population (Jamrog et al., 2018). Here, by combining genetic and functional assays, together with gene expression and chromatin accessibility profiling, we deciphered the biological mechanisms by which PAX5::ELN oncoprotein reprograms normal B-cell progenitors and leads to the emergence of quiescent pre-LSCs.

Moreover, our transcriptional regulatory network (TNR) strongly suggests that a set of transcription factors (TFs) to control pre-LSC reprogramming, including Egr1 that represents a primary candidate TF to regulate the quiescence/resistance of pre-LSCs and of leukemic cells from human B-ALL.

## Results

### PAX5::ELN oncoprotein induces aberrant phenotype and function in pre-leukemic B-cells.

Adult B-cell development is initiated in the bone marrow (BM) by the entry of hematopoietic progenitors into the B-cell lineage transcription program and the sequential rearrangement of immunoglobulin heavy (IgH) and light (IgL) chain loci through V(D)J recombination (Hardy et al., 2000). Phenotypic characterization of the different B-cell subsets in mice using a combination of cell surface markers was established (Fig. S1 A) (Aurrand-Lions and Mancini, 2018). We previously developed a transgenic mouse model in which the human cDNA encoding the PAX5::ELN oncoprotein was inserted within the *IgH* locus to ensure an early and B-cell-restricted expression (Jamrog et al., 2018). To determine whether PAX5::ELN oncoprotein perturbs the normal B-cell development at the pre-leukemic stage, we performed a multi-parametric staining by FACS covering exhaustively the steps of B-cell differentiation (Fig. S1 A and Table S1). Unsupervised clustering allowed the visualization of the natural phenotypic progression of B-cells throughout differentiation and showed that all the normal B-cell subpopulations are present in pre-leukemic PAX5::ELN ( $PE^{tg}$ ) mice, as compared to wild type (wt) littermates (Fig. 1 A, B and Fig. S1 B, C). However, an aberrant population of B-cell progenitors (aberrant-B) is present in the  $PE^{tg}$  BMs (Fig. 1 A and B), featuring low expression of B220 ( $B220^{low}$ ) and inappropriate expression of Kit (CD117), IL7r (CD127), IgM and  $\lambda 5$  (CD179b) (Fig. 1 C), and which is directly associated with the transgene expression (Fig. S1 D). Exploration of BP1, CD2, CD25 (IL2 $\alpha$ ), and Ig $\kappa/\lambda$  markers revealed a phenotypic progression within the aberrant-B population that is reminiscent of normal B-cell differentiation (Fig. 1 A). Together, these results indicate that PAX5::ELN oncoprotein induces a partial blockade of differentiation associated with the emergence of an aberrant B-cell population in steady state condition.

To explore the functional impact of PAX5::ELN oncoprotein on pre-leukemic B-cells, we performed serial transplantations of wt and  $PE^{tg}$  pre-leukemic total B-cells (Fig. 1 D). Short-term reconstitution potential was assessed by analyzing the BM engraftment 2 weeks after transplantations in primary and secondary recipient mice. In contrast to normal B-cells that are devoid of self-renewal potential, pre-leukemic B-cells efficiently engrafted over primary and secondary recipients (Fig. 1 E). The phenotypic characterization of engrafted cells confirmed that this short-term self-renewal activity is associated with the selection and the expansion of the aberrant B-cell population (Fig. 1 F). Indeed, this phenotype was strongly stable over primary and secondary recipients (Fig. S1 E), as exemplified by the high level of Kit expression (Fig. 1 F). Moreover, tertiary transplantations of pre-leukemic B-cells eventually led to long-term B-ALL development in about 5 months (Fig. 1 G), which is the delay required to acquire the full pattern of transforming secondary mutations (Jamrog et al., 2018). Strikingly, fully transformed leukemic blasts from tertiary recipients exhibited a distinct phenotype (Fig. 1 F and Fig. S1 E) and were able to efficiently propagate B-ALL few days only after quaternary transplantations, even with low doses of injected cells (Fig. S1 F). Finally, Kit<sup>+</sup> and Kit<sup>-</sup> B-cells from  $PE^{tg}$  BMs were purified to compare their short-term engraftment capacity after transplantation in primary mice (Fig. S1 G). We controlled that purified Kit<sup>+</sup> cells from wt mice were devoid of engraftment potential, and that the aberrant self-renewal potential of  $PE^{tg}$  B-cells was well enriched in the Kit<sup>+</sup> compartment (Fig. 1 H). Moreover, we confirmed that only Kit<sup>+</sup> pre-leukemic B-cells sustained the long-term B-ALL development after secondary transplantation (Fig. S1 G and Fig. 1 I). Together, our results suggest that PAX5::ELN oncoprotein converts Kit<sup>+</sup> B-cell progenitors into pre-LSCs that have acquired *de novo* self-renewing activity in the first steps of the disease.

### Pre-leukemic cells restricted in the cell-cycle are chemo-resistant and support leukemia initiating activity.

Cell-cycle restriction is a critical feature of normal hematopoietic stem cells (HSCs) to preserve their self-renewal function (Wilson et al., 2008). We therefore hypothesized that cell quiescence could be a biological mark of pre-LSCs in the  $PE^{tg}$  model. To test this hypothesis, we analysed Ki67 expression in the different B-cell subsets of wt and  $PE^{tg}$  pre-leukemic mice in steady state condition (Fig. 2 A and Table S1). As expected, Ki67 expression followed the physiological proliferation rate of normal B-cell differentiation (Tomura et al., 2013) in wt and  $PE^{tg}$  mice (Fig. 2 A, B and Fig. S2 A). Furthermore, non-cycling Ki67<sup>-</sup> cells were detected within the aberrant  $PE^{tg}$  B-cell population (Fig. 2 A, B and Fig. S2 A). Since cell-cycle restriction is also an important characteristic of treatment-resistant cells in B-ALL (Ebinger et al., 2016; Turati et al., 2021), we assessed the drug sensitivity of negative and positive Ki67



pre-leukemic cells to classical B-ALL chemotherapeutic agents. *In vitro* dose-responses of doxorubicin (DOXO), methotrexate (MTX) and vincristine (VCR) on the aberrant  $PE^{tg}$  B-cell population suggested that  $Ki67^{-}$  cells were less sensitive to the three chemotherapeutic agents than  $Ki67^{+}$  cells (Fig. 2 C and Fig S2 B).

To further address the question of whether PAX5::ELN perturbs the cell-division kinetic of pre-leukemic B-cells, wt and  $PE^{tg}$   $Kit^{+}$  B-cells were labelled with the cell trace violet (CTV) and cultured for 3 days (Fig. 2 D). This *in vitro* cell-division assay indicated that PAX5::ELN reduced the global proliferation rate of pre-leukemic cells and revealed the persistence of an undivided (D0) population (Fig. 2 E, F) that maintained the expression of Kit (Fig. S2 C). Next, we purified the slow-cycling (D0-2)  $PE^{tg}$  B-cells population, which represents less than 1% of total generated cells, and which are undetectable in CTV-labelled wt counterparts cultured in the same experimental conditions (Fig. 2 E, F). High-cycling (D8-9) cells from both wt and  $PE^{tg}$  conditions were also purified as controls (Fig. 2 E). RNA-sequencing demonstrated the presence of PAX5::ELN fusion transcript in both D0-2 and D8-9 pre-leukemic cells (Fig. S2 D) and their polyclonality of  $V_H(D_H)J_H$  and  $V_LJ_L$  rearrangements (Fig. 2 G), confirming their pre-leukemic state. These cells were then treated *in vitro* separately by DOXO, MTX or VCR (Fig. 2 D, H), with a sublethal concentration that we previously determined by dose-response experiments on total wt and  $PE^{tg}$   $Kit^{+}$  B-cells (Fig. S2 E). This assay revealed a significant resistance of slow-cycling  $PE^{tg}$  D0-2 cells in contrast to wt and  $PE^{tg}$  D8-9 cells (Fig. 2 H). To address at the functional level the role of cell-cycle restriction in pre-LSC activity, equal numbers of D0-2 and D8-9 pre-leukemic cells were transplanted (Fig. 2 D). Both D0-2 and D8-9 pre-leukemic  $PE^{tg}$  B-cells were able to engraft the BM of recipient mice 3 weeks after transplantation (Fig. 2 I). However, only donor-derived D0-2  $PE^{tg}$  cells maintained high-level expression of Kit *in vivo* (Fig. S2 F), sustained the reconstitution 16 weeks after transplantation (Fig. 2 I), and the long-term B-ALL development (Fig. 2 J). Together, our results indicate that cell-cycle restriction of pre-leukemic cells is associated with chemo-resistance and leukemia initiation.

### **PAX5::ELN oncoprotein disrupts the differentiation of pre-leukemic cells by enforcing the IL7r/JAK-STAT signaling pathway.**

PAX5::ELN perturbs the B-cell differentiation (Fig. 1) and the cell-cycle of pre-leukemic cells (Fig. 2). Thus, we asked whether the main B-cell differentiation molecular programs are affected by PAX5::ELN in slow- and high-cycling pre-leukemic cells. The early B-cell development is controlled by the IL7 and pre-BCR receptors, two interacting signaling systems that tightly coordinate alternative phases of cell survival and differentiation through the JAK-STAT and pre-BCR/BLNK pathways, respectively (Clark et al., 2014; Reth and Nielsen, 2014). Each pathway has antagonistic and balanced functions to coordinate the proliferation and differentiation switch at the pre-B stage (Fig. 3 A). Interestingly, IL7r is strongly expressed in the aberrant  $PE^{tg}$  B-cell population, together with the accumulation of the surrogate light chain  $\lambda 5$  at their surface (Fig. 1 C). Thus, we analysed IL7r and pre-BCR/BLNK pathways by using a phosphoflow cytometry approach after ligand and chemical *ex vivo* stimulations, respectively (Fig. S3 A and Fig 3 B). Ligand stimulation of IL7r efficiently induced the phosphorylation of its two downstream effectors, STAT5 and FOXO1, in the aberrant-B ( $B220^{low}$ )  $PE^{tg}$  population, in a similar way to normal ( $B220^{high}$ ) pro-B cells (Fig. S3 A and Fig 3 B, left panels). We also assessed the (pre-)BCR signaling response by mimicking its downstream activation *ex vivo* with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (Fig. S3 A and Fig. 3 B), a well-known inducer of BLNK/PLC $\gamma$ 2 phosphorylation cascade (Patterson et al., 2015; Reth, 2002). As expected,  $H_2O_2$ -induced phosphorylation of BLNK and PLC $\gamma$ 2 was seen along the normal B-cell differentiation pathway. In contrast, the aberrant  $PE^{tg}$  B-cell population was unresponsive to BLNK/PLC $\gamma$ 2 stimulation (Fig. S3 A and Fig 3 B, right panels).

Interestingly, ligand stimulation of IL7r efficiently induced the phosphorylation of STAT5 in both  $Ki67^{+}$  and  $Ki67^{-}$  cells within the aberrant  $PE^{tg}$  B-cell population, which is abrogated in the presence of tofacitinib, a well-known JAK-STAT inhibitor (Fig. 3C, lower panels). In contrast, IL7r activation is concentrated in cycling  $Ki67^{+}$  cells from normal B-cells (Fig. 3C, upper panels), that correspond to highly cycling pro-B cells (Fig. 2 B and Fig. S2 A). Moreover, gene set enrichment analysis from the RNA-sequencing of purified  $PE^{tg}$  D0-2,  $PE^{tg}$  D8-9 and wt D8-9 cells (Fig. 2 D) confirmed that the IL7r/JAK-STAT axis was significantly up-regulated by PAX5::ELN oncoprotein in slow- and high-cycling pre-leukemic cells (Fig. S3 B). This observation was reinforced by the comparison of our

PAX5::ELN-modified genes with the Stat5-binding genes arising from the ChIP-sequencing of murine *Stat5b*-induced B-ALL cells (Katerndahl et al., 2017), showing a substantial enrichment of Stat5 targets in PAX5::ELN up-regulated genes in slow- (D0-2) and high- (D8-9) cycling pre-leukemic cells (Fig. 3 D). Accordingly, the downstream targets of IL7r/JAK-STAT axis, including the pro-survival genes *Cdkn2a*, *Il2ra*, *Tnfrsf13b* and *Socs3* were significantly activated in both D0-2 and D8-9 cells (Fig. 3 E). In contrast, several components of the pre-BCR/BLNK signaling including *CD79b*, *CD79a*, *Lyn*, *Syk*, *Blnk*, *Ikzf3* and *Irf8* were down-regulated in both D0-2 and D8-9 cells (Fig. 3 E). Among them, the pre-B cell differentiation genes *Blnk*, *Ikzf3* and *Syk* also belong to Stat5 targets (Fig. 3 D), reinforcing the notion that IL7r/JAK-STAT axis negatively regulates the B-cell differentiation (Fig. 3 A).

Collectively, combined to our phosphoflow cytometry results, our RNA-seq data suggest that the activation of IL7r/JAK-STAT pathway and the absence of BLNK retro-control favor the maintenance and survival of pre-leukemic cells, in slow- and high-cycling fractions.

### **B-cell molecular identity is impaired in quiescent pre-LSCs.**

While the above results demonstrate that leukemia initiating potential is enriched in slow-cycling population, the imbalance between IL7r/JAK-STAT and pre-BCR/BLNK molecular circuits is a shared feature of all PAX5::ELN pre-leukemic cells. Thus, to further identify and characterize quiescent pre-LSCs, we generated *PE<sup>tg</sup>::H2B-GFP<sup>tg</sup>* mice, derived from doxycycline-inducible *H2B-GFP<sup>tg</sup>* mice, an *in vivo* model allowing the study of cell-quiescence in normal HSCs (Foudi et al., 2009; Wilson et al., 2008). After a doxycycline pulse, we compared the cell-division kinetics *in vivo* between wt and pre-leukemic *PE<sup>tg</sup>* B-cells based on the loss of GFP expression during a time course of doxycycline chase (Fig. 4 A). At the end of doxycycline pulse, almost all B-cells in both wt and pre-leukemic BM expressed the H2B-GFP marker (Fig. 4 B). However, the decrease of GFP after the withdrawal (chase period) of doxycycline revealed a substantial delay of the global GFP loss in pre-leukemic *PE<sup>tg</sup>* B-cells, with the persistence of GFP<sup>high</sup> *PE<sup>tg</sup>* cells after one-week chase of doxycycline (Fig. 4 B). Based on the loss of GFP after 2- and 3-weeks chase of doxycycline, we defined GFP<sup>high</sup> cells as quiescent rather than dormant cells, such as reported for normal stem cells (Foudi et al., 2009; Wilson et al., 2008). Therefore, we adapted the multi-parametric staining to identify the quiescent GFP<sup>high</sup> B-cell subset. Quiescent cells were exclusively found in the aberrant B-cell population of *PE<sup>tg</sup>* BM (Fig. S4 A and Fig. 4 C). Additionally, we observed that GFP loss was proportional to the acquisition of the Ki67 marker, almost all GFP<sup>high</sup> cells did not express Ki67 (Fig. 4 D) and only this non-cycling population sustained engraftment capacity after transplantation (Fig. 4 E).

To refine the molecular characterization of quiescent pre-LSCs *in vivo*, GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells were purified from aberrant-B cells of *PE<sup>tg</sup>H2B-GFP<sup>tg</sup>* mice after one-week chase of doxycycline and an integrative molecular approach was performed comparing both gene expression profiles by RNA-sequencing and chromatin accessibility by ATAC (assay for transposase-accessible chromatin) sequencing (Fig. 4 F) (Buenrostro et al., 2013). Transcriptome analysis identified 836 up-regulated and 789 down-regulated genes with an expression difference of more than 1.5-fold and an adjusted P value of <0.05 in quiescent GFP<sup>high</sup> pre-LSCs (Fig. 4 F and Table S3). Combined to an expected down-regulation of cell-cycle related pathways, the analysis revealed that cytokine signaling pathways were up-regulated in quiescent GFP<sup>high</sup> pre-LSCs (Fig. S4 B). Indeed, these modifications, involving the down-regulation of E2f/Myc targets and the up-regulation of TNF $\alpha$  signaling (Fig. S4 B), are crucial for HSC and CSC survival (Cabezas-Wallscheid et al., 2017; Vazquez-Santillan et al., 2015; Yamashita and Passegue, 2019; Zhang et al., 2022). Differentially accessible chromatin regions were revealed by ATAC-seq analysis in pre-leukemic GFP<sup>high</sup> (7439 peaks) and GFP<sup>low</sup> (5360 peaks) cells (Fig. 4 F and Table S4). Their associated genes were enriched for molecular pathways similar to those identified at the mRNA level (Fig. S4 B, C). These observations highlight the direct relationship between the expression of genes and their surrounding accessibilities, allowing the identification of specific regulators.

To this end, we combined footprinting analysis using hint-ATAC and “diffTF” computational tools (Berest et al., 2019) to identify and classify TF motif accessibilities that were differentially-regulated in quiescent GFP<sup>high</sup> pre-LSCs (Fig. 4 G). In particular, we observed that the motif accessibility of critical TFs involved in the B-cell identity such as Ebf and Pax, or in the cell-cycle such as E2f, were significantly down-regulated in quiescent GFP<sup>high</sup> pre-LSCs (Fig. 4 G and Fig. S4 D). Accordingly, Pax5-repressed genes, but not Pax5-activated genes (Revilla et al., 2012), were drastically enriched in

GFP<sup>high</sup> pre-LSCs (Fig. 4 H and Fig. S4 E). These results suggest that Ebf1 and Pax5 have lost their repressive activity in quiescent pre-LSCs, allowing the up-regulation of a non-B-cell molecular program. Indeed, we observed the up-regulation of the chromatin accessibility to Spi and Runx motifs in quiescent GFP<sup>high</sup> pre-LSCs (Fig. 4 G). This was associated with increased expression of Spi1 (PU.1) and Runx1 (Fig. S4 F), two critical TFs regulating the quiescence and the myeloid differentiation process of normal HSCs (Chavez et al., 2021; Imperato et al., 2015; Staber et al., 2014). This observation was also associated with a downstream activation of a myeloid program in quiescent GFP<sup>high</sup> pre-LSCs at the transcriptional level. Indeed, the analysis mainly revealed the up-regulation of genes involved in TNF $\alpha$  signaling and in myeloid differentiation in GFP<sup>high</sup> pre-LSCs (Fig. 4 I). Finally, we observed a strong enrichment of both murine (Fig. 4 J) (Venezia et al., 2004) and human (Fig. S4 G) (Garcia-Prat et al., 2021) dormant/quiescent HSC signature in the GFP<sup>high</sup> pre-LSCs, suggesting redundant molecular mechanisms between pre-LSCs and HSCs. Collectively, our data indicate that quiescent pre-LSCs partially lose B-lineage molecular identity, and concomitantly reactivate an inappropriate and immature transcriptional program.

### **MLP/HSPC molecular signatures are partially reprogrammed in quiescent pre-LSCs.**

The above findings raise the question as to what extent stem cell-like molecular features are reprogrammed in quiescent pre-LSCs. Thus, we integrated our results within ATAC-seq and RNA-seq data from the Immunological Genome Project (ImmGenn) consortium (<https://www.immgen.org/>). First, we extracted both chromatin accessibility and gene expression profiles from normal hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) (LT-HSCs, MPP1, ST-HSCs, MPP4), multi-lymphoid progenitors (MLPs), common lymphoid progenitor (CLP), Fr.A (*i.e.* Pre-pro-B) and B-cells (Fr.B/Pro-B to Fr.E/immature-B) (Fig. 5 A and Fig. S5 A, B). Then, differentially accessible peaks and expressed genes from pre-leukemic GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells were clustered by a k-means approach according to their signal in the different steps of the normal differentiation (Fig. 5 A-C). Strikingly, ATAC-seq data revealed that open chromatin regions from HSPCs, including LT-HSCs and other multipotent immature progenitors (clusters C1 to C4), were enriched in quiescent GFP<sup>high</sup> pre-LSCs, contrasting in this regard with GFP<sup>low</sup> cycling cells that were rather enriched in accessible regions from committed B-cells (clusters C7, C8) (Fig. 5 B). Furthermore, RNA-seq data identified four clusters of genes in pre-leukemic GFP<sup>high</sup> and three clusters of genes in GFP<sup>low</sup> cells. This analysis notably revealed a unique “HSPC<sup>like</sup> cluster” in quiescent GFP<sup>high</sup> cells, composed of genes mostly up-regulated in LT-HSCs, MPP1, ST-HSCs and MPP4 fractions (Fig. 5 C). A “MLP<sup>like</sup> cluster” was also defined in quiescent GFP<sup>high</sup> cells, composed of genes up-regulated in CLP and pre-pro-B precursors, two populations that retain multi-lymphoid potential (Fig. 5 C). Moreover, our global analysis revealed that this MLP signature is strongly activated in quiescent GFP<sup>high</sup> cells (Fig. S5 A), also observed in human B-ALL chemo-resistant cells (Turati et al., 2021).

These observations revealed at the transcriptional level the plasticity and reprogramming of quiescent pre-LSCs, that can partially reactivate a non-B-cell molecular program.

### **Transcriptional Regulatory Network reveals Egr1 to control pre-LSC quiescence.**

According to the global up-regulation of the cell-cycle program in GFP<sup>low</sup> cells (Fig. 4 I and Fig. S4 B), we identified a cluster of genes named “Cell-cycle<sup>like</sup> cluster”, whose expression pattern followed the normal proliferation rate of each subset in the differentiation (Fig. 5 C). Conversely, a “Quiescence<sup>like</sup> cluster” corresponding to the mirror image of the “Cell-cycle<sup>like</sup> cluster” was detected within GFP<sup>high</sup> cells (Fig. 5 C and Fig. S5 B).

To predict the “core” TFs defining pre-LSC identity, and in particular pre-LSC quiescence, we built a transcriptional regulatory network (TRN) from ATAC-seq (Fig. 5 B) and RNA-seq (Fig. 5 C) data using LASSO-StARS algorithm (Miraldi et al., 2019; Pokrovskii et al., 2019). This algorithm integrates (*i*) motif analyses, (*ii*) differential accessibility motifs and (*iii*) gene expression in order to construct a set of TFs-genes interactions. This analysis predicted TFs that positively (activating) or negatively (repressive) regulate their target genes (Fig. S5 C). Thus, we contrasted five specific TRNs (#1 to #5) to one shared TRN involved in the pre-LSC signature (Fig. 5 D). In particular, a quiescence module (TRN #1) was identified in GFP<sup>high</sup> pre-LSCs composed of four TFs (Egr1, Mnt, Klf6 and Atf3) (Fig. 5 D). Among them, *Early growth response 1* (Egr1) regulates the higher number of target genes (121 activated and 242 repressed genes). Moreover, Egr1 was the top predicted TF to regulate positively

the quiescence and negatively the cell-cycle (TRN#1, Fig. 5 D). Accordingly, we observed a strong down-regulation of the “Quiescence<sup>like</sup> cluster” and up-regulation of the “Cell-cycle<sup>like</sup> cluster” in human HSPCs in which EGR1 has been silenced by RNA interference (Stoddart et al., 2022) (Fig. 5 E). Consistent with the critical role of Egr1 in controlling normal HSC dormancy and functions (Cabezas-Wallscheid et al., 2017; Min et al., 2008; Scheicher et al., 2015), our result suggests that it may be also relevant in pre-LSCs. Finally, we built the molecular network of genes involved in the TRN#1 from Fig. 5 D that are positively regulated by Egr1, Mnt, Klf6 and Atf3 (Fig. 5 F and Fig. S5 D). Strikingly, several members of the network such as the TFs Atf3 (Liu et al., 2020) and Klf6 (Adelman et al., 2019), the GTPase Gimap5 (Chen et al., 2011) and the transcriptional co-activator Taz (Althoff et al., 2020) have been also documented to control HSC functions.

Collectively, the data arising from our integrative molecular approach predicts a list of TFs and their target genes to control molecular reprogramming in pre-LSCs and highlights Egr1 as a strong candidate to regulate pre-LSC quiescence.

### **EGR1 is activated in quiescent and therapy-resistant leukemic blasts from human B-ALL.**

Finally, we addressed the relevance of the expression modifications of murine pre-LSCs in human resistant and quiescent leukemic cells. Interestingly, the down-regulation of E2f/Myc targets (Fig. 4 G and Fig. S4 B) and cell cycle/oxidative phosphorylation program (Fig. 4 I), combined with the up-regulation of TNF $\alpha$  signaling (Fig. 4 I) and HSPC/MLP signatures (Fig. 5 C) that we identified in GFP<sup>high</sup> pre-LSCs from the PAX5::ELN model, have been also observed in treatment-resistant (Minimal Residual Disease, MRD) cells and in CFSE label-retaining cells (LRC) from B-ALL patient-derived xenografts (PDXs) in two independent studies (Ebinger et al., 2016; Turati et al., 2021). These molecular similarities (Fig. 6 A, B and Fig. S6 A), suggest that PAX5::ELN pre-LSC signature mimics in some aspect the resistance/quiescence of human B-ALL cells.

Thus, we explored *EGR1* expression in resistant and/or quiescent human B-ALL cells. We transplanted leukemic blasts from two “*de novo*” *ETV6-RUNX1* B-ALL patients (HB#010 and HB#007) into immunodeficient NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tmWjl</sup> (referred as NSG) mice and monitored for engraftment before treatment with a chemotherapeutic cocktail (DEXA+VCN) or vehicle control (Fig. 6 C, D and Fig. S6 B, C). Strikingly, B-ALL progression was prevented in chemotherapy-treated mice characterized by a significant reduction of the leukemic burden in the BM and the spleen (Fig. 6 E, F and Fig. S6 D, E). This drastic reduction of human B-ALL cells *in vivo* was associated with a resistance of quiescent Ki67<sup>-</sup> leukemic blasts (Fig. 6 G and Fig. S6 F). This resistance is associated with a significant up-regulation of *EGR1* transcript in purified residual leukemic blasts (Fig. 6 H and Fig. S6 G). Based on these observations, we hypothesized that *EGR1* expression was already up-regulated in quiescent cells within the tumor burden of B-ALL. Leukemic blasts from two other *ETV6::RUNX1* B-ALL patients (HB#002 and HB#008) were labelled with CTV and co-cultured on MS5 stromal cells (Fig. 6 I and Fig. S6 H). Strikingly, our data showed the feasibility of identifying undividing/slow-dividing cells from “*de novo*” B-ALL samples using this *in vitro* cell-division approach (Fig. 6 J and Fig. S6 I). Of note, we observed that these cells were enriched in the CD45<sup>neg/low</sup> phenotype (Fig. 6 J and Fig. S6 I), which has been associated with drug-tolerant leukemic clones leading to B-ALL relapse in patients (Dobson et al., 2020). Therefore, we confirmed that *EGR1* expression was higher in purified undivided (CTV<sup>high</sup>) B-ALL cells from the two patients, as compared with cycling (CTV<sup>low</sup>) leukemic cells (Fig. 6 K and Fig. S6 J). Together, our observations suggest that *EGR1* overexpression is a “*de novo*” molecular characteristic of quiescent/resistant cells within the tumor bulk.

Finally, we took advantage of the RNA-seq and clinical data of a large cohort of B-ALL patients (Gu et al., 2019) to explore *EGR1* expression and its clinical outcome. The analysis of the event-free survival (EFS) curves showed that the clinical outcome was drastically affected for all B-ALL patients with high level of *EGR1* (Fig. S6 K). This is partially explained by the observation that *EGR1* expression was higher in high-risk genetic subgroups (*i.e.* Ph-like and *KMT2A*-rearranged sub-groups) than in B-ALL sub-groups associated with a better prognosis (*i.e.* *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, hyperdiploid and *PAX5alt*) (Inaba and Pui, 2021) (Fig. S6 L). Furthermore, the poor clinical outcome was also strikingly associated with *EGR1* expression within the different B-ALL oncogenic subgroups (Fig. 6 L). Collectively, our observations strongly suggest that cell-quiescence and *EGR1* activation are a common and an oncogene-independent feature of treatment-resistant B-ALL cells.

## Discussion

In the present study, we found that a single primary oncogenic event of B-ALL is sufficient to confer stem cell-like features to a subset of committed B-cell progenitors, converting them to pre-LSCs. Combined to an unsupervised clustering representation of FACS data, our multi-parametric immunophenotypic approach allowed for a precise visualization of the normal progression of B-cells throughout differentiation. In addition, this strategy revealed concomitantly the presence of an aberrant B-cell population in pre-leukemic *PE<sup>tg</sup>* mice, characterized by the abnormal co-occurrence of phenotypic markers. To date, this exhaustive coverage of the B-cell differentiation has not yet been described in leukemic mouse models, mainly limited by the number of simultaneously assayed markers. However, the identification of aberrant antigen co-expression is commonly used in clinic to define the minimum residual disease (MRD) in B-ALL (Cherian and Soma, 2021; Hassanein et al., 2009), based on the principle that leukemic cells express phenotypic features that can be used to distinguish them from normal hematopoietic cells. Moreover, the development of single-cell mass cytometry (CyTOF) approach, quantifying simultaneously a large number of surface markers and intracellular phosphorylated proteins, allowed for the identification of several features involved in normal and pathological B-cell development in human with unprecedented resolution (Bendall et al., 2014; Good et al., 2018). Thus, our approach reinforces the notion that exploring abnormal co-expression using a large number of phenotypic markers is a valuable approach to predict aberrant differentiation state occurring in cells.

Combined to our RNA-sequencing, the integration of intracellular phosphorylated proteins established that the ectopic activation of IL7r/JAK-STAT pathway, which is normally shut down by the pre-BCR/BLNK axis, favors the differentiation blockade of pre-leukemic cells. Thus, the imbalance between the IL7r/JAK-STAT pathway and pre-BCR/BLNK axis appears as a critical feature of B-ALL initiation. Interestingly, this molecular imbalance, including unresponsive pre-BCR signaling, has been shown to predict patient relapse in B-ALL (Good et al., 2018). Moreover, secondary alterations in human B-ALL frequently mimic cytokine-receptor signaling through the constitutive phosphorylation of STAT5 (*IL7R*, *CRLF2* and *JAK* mutations) or mimic the pre-BCR downstream pathway through the constitutive activation of the RAS/MAPK signalling (*NRAS*, *KRAS* and *PTPN11* mutations) (Jamrog et al., 2018; Mullighan et al., 2007). It has been recently demonstrated that mutations in these two pathways are mutually exclusive in human B-ALL (Chan et al., 2020). In addition, the concurrent reactivation of one pathway affects the activity of the other and reciprocally, leading to the subversion of B-ALL transformation (Chan et al., 2020). B-ALL development in the PAX5::ELN model is also associated with the acquisition of secondary mutations in genes of either JAK/STAT (*Jak3* mutations) or RAS/MAPK (*Kras* and *Ptpn11* mutations) signaling pathways (Jamrog et al., 2018). These observations therefore suggest that secondary mutations either reinforce the aberrant activation of the JAK/STAT pathway already primed in pre-leukemic cells, or allow for a bypass of pre-BCR signalling deficiency to trigger B-ALL transformation.

Various studies suggest that restricted cell-cycle is an important mechanism of therapeutic resistance in both human and murine leukemia models (Ebinger et al., 2016; Gerby et al., 2016; Prost et al., 2015; Tremblay et al., 2018; Trumpp et al., 2010; Turati et al., 2021). In parallel with an *in vitro* cell-division assay, we used the doxycycline-inducible *H2B-GFP<sup>tg</sup>* mouse model to demonstrate *in vivo* the existence of a slow-cycling and drug-resistant population of pre-LSCs in the PAX5::ELN-induced B-ALL model. In particular, our work corroborates that self-renewal and clonal evolution could be restricted to a rare and slow-cycling population of pre-leukemic cells, as previously observed in the *Lmo2*-induced T-ALL model (Tremblay et al., 2018). This not only reinforces the importance of cell-cycle restriction in pre-LSC activities in two distinct lineages, but also makes the *H2B-GFP* system as a powerful *in vivo* tool to develop strategies targeting the quiescence and the resistance of relapse-inducing clones in different models.

Additionally, the present study brings new insights regarding the molecular mechanisms of the cell-of-origin of B-ALL demonstrating that quiescent pre-LSCs are characterized by a partial loss of B-cell lineage identity and activate an HSPC-like molecular program. This finding is in agreement with pioneer works in AML and T-ALL demonstrating that a primary oncogene can activate an aberrant stem cell-like program in committed myeloid progenitors (Krivtsov et al., 2006) or in thymocytes (McCormack et al., 2010). While the presence of PAX5::ELN induces the emergence of quiescent cells in committed B-cells, its expression level in quiescent and cycling cells is quite similar. Notwithstanding

the fact that functional and molecular stem cell-like features were focused in quiescent cells, this observation raises at least two questions: (i) whether cell-cycle restriction is a common aberrant characteristic of pre-LSCs or is a critical property to prime leukemia initiation, and (ii) whether stem cell properties of pre-LSCs such as self-renewal, drug-resistance and leukemia initiating activity are reversible processes, as demonstrated on human B-ALL blasts (Ebinger et al., 2016).

The question of whether a primary genetic alteration induces sufficient molecular and functional plasticity to cause lineage subversion remains poorly explored. A previous investigation on the cell-of-origin in mixed phenotype acute leukemia (MPAL) supports the notion that a founding alteration, rather than the secondary events, induces lineage plasticity in pre-leukemic clones (Alexander et al., 2018). Another study using lineage-specific oncogene activation also shows that *ETV6::RUNX1* fusion protein can induce both B-ALL and T-ALL, and that leukemia transformation is dependent on the nature of the secondary mutations (Rodriguez-Hernandez et al., 2021). While *ETV6::RUNX1* is associated with B-ALL in human, this work suggests that pre-leukemic clones can exhibit a T-cell potential when expressed in the appropriate lineage. Our results revealed that the TF activity of PAX5 and EBF1, considered as master factors to maintain B-cell identity by suppressing alternative lineage choices (Busslinger, 2004; Nutt et al., 1999; Ramamoorthy et al., 2020), is down-regulated in quiescent pre-LSCs. Their down-regulation is associated with the up-regulation of PU-1 and RUNX1, and with the activation of a non-B-cell molecular program. Integrating chromatin accessibility and gene expression data recently brought major insights and facilitated the identification of putative regulatory regions and their candidate binding TFs, thus allowing a more precise definition of the regulatory networks in immune cells (Miraldi et al., 2019; Pokrovskii et al., 2019). Here, we applied this computational method to build cluster-specific TRNs that define the molecular identity and plasticity of quiescent pre-LSCs in our model. In particular, this approach allowed us to identify *Egr1* as a strong TF candidate regulating positively pre-LSC quiescence. This observation is consistent with its critical role in controlling normal HSC dormancy, localization and functions, that have been described using both *Egr1*<sup>-/-</sup> mouse model (Min et al., 2008) and RNA interference in human CD34<sup>+</sup> cord blood-derived HSPCs (Stoddart et al., 2022). Finally, molecular similarities with resistant clones in B-ALL patients after chemotherapy (Ebinger et al., 2016; Turati et al., 2021), including the up-regulation of *EGR1*, strongly make our PAX5::ELN quiescent pre-LSCs as a relevant drug-resistant cellular platform to develop new targeted therapies.

## Materials and Methods

### Mice.

*PAX5::ELN* (*PE*<sup>tg</sup>) transgenic mouse model was developed by our team as previously described (Jamrog et al., 2018). Briefly, cDNA encoding the human *PAX5::ELN* fusion protein was inserted at the *IgH* locus under the control of a VH promoter (PVH) and the endogenous E $\mu$  enhancer to trigger *PAX5::ELN* expression in the early phase of B-cell development. The previously developed inducible *TetOP-H2B-GFP* (*H2B-GFP*<sup>tg</sup>) mouse model (Foudi et al., 2009) was purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Homozygous *PE*<sup>tg</sup> and *H2B-GFP*<sup>tg</sup> were maintained by cross-breeding, their genotypes were verified by PCR and all the experiments were performed in heterozygous mice. C57BL6 (Ly6.2, CD45.2) mice were purchased from Charles River Laboratories (France) and Pep3b (Ly6.1, CD45.1) B6.SJL congenic mice were initially obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). All animals were housed in pathogen-free conditions (Anexplo US006 CREFRE, Toulouse, France) in accordance with the European Directive 2010/63/EU and the French Institutional Guidelines for animal handling. Mice were handled according to protocols approved by the Regional Ethical Committee (Agreement #A31555010). Mice were backcrossed into the C57BL6 background for more than 10 generations.

### FACS analysis and cell sorting.

Single cell suspensions were prepared from bone marrow (BM) of wt and *PE*<sup>tg</sup> mice of the indicated ages in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco) supplemented with 2% Fetal Bovine Serum (FBS) (Stemcell technologies). Immunostainings were performed using antibodies for flow cytometry obtained from Pharmingen (BD Biosciences), Invitrogen and Miltenyi are listed in Table S1. FACS analysis was performed on a Fortessa cytometer (BD Biosciences) using FlowJo (BD Biosciences) software. For surface staining, cells were incubated with the antibodies for 20 minutes in IMDM 2% FBS at 4°C and washed twice with PBS1X before analysis. For cell-cycle analysis, cells were fixed and permeabilized (CytofixCytoperm Plus, BD Bioscience) during 30 minutes before the staining with the anti-Ki67 antibody, in accordance with the manufacturer's instructions. For cell sorting, BM cells from wt or pre-leukemic *PE*<sup>tg</sup> mice were flushed and B-cell fraction were enriched by B220 magnetics microbead sorting (Miltenyi Biotech). B-cell fraction was subsequently incubated with anti-CD19, -CD23 and -Kit antibodies listed in Table S1. Cell sorting of Kit<sup>+</sup> and Kit<sup>-</sup> (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>) B-cells was performed on a MoFlo Astrios sorter (Beckman Coulter).

### UMAP analysis.

UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) analysis was performed using FlowJo software. At least 4 samples per condition were pre-gated on single cells of the population of interest. Then, informatic cleaning and normalization were performed using FlowAI package (V2.1) (Monaco et al., 2016) and CytoNorm package (V1.0) (Van Gassen et al., 2020) for each sample and the same number of cells were then concatenated. Arc sin transformation was performed manually for each marker to discriminate the different B-cell populations. The dimension reduction algorithm UMAP (umap-learn Python package v2.4.0) (Becht et al., 2018) was run using Euclidian distance with 15 nearest neighbors and 0.5 distance parameters. Thus, the UMAP analysis was performed using a multiparametric staining by FACS integrating the 12 markers shown in Fig. S1 A covering all the steps of the B-cell differentiation. UMAP representation of the cell density, of the clustering analysis of the different B-cell subpopulations based on the gating strategy shown in Fig. S1 B, C. In the UMAP analyses, each subset is represented by one color. Black arrow indicates the physiological phenotypic progression of B-cells in the differentiation and red dotted line delimits the aberrant pre-leukemic B-cell population induced by *PAX5::ELN*.

### In vitro co-culture assays

B-cell populations were co-cultured on MS5 stromal cells in a B-cell medium composed of IMDM 10% FBS, 0.05 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 2mM L-glutamine (Invitrogen), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 units/ml), supplemented with 5ng/mL of murine Il7, 10ng/mL of murine Flt3L and 10ng/mL of murine SCF (Peprotech).

#### In vivo transplantation assays.

Donor and recipient mice were on C57BL6 (Ly6.2, CD45.2) and Pep3b (Ly6.1, CD45.1) backgrounds, respectively, allowing for the discrimination of host and donor-derived cells on the basis of CD45 alleles. Donor B-cell populations from the BM of wt or pre-leukemic and leukemic  $PE^{tg}$  mice (CD45.2<sup>+</sup>) were transplanted intravenously (IV) in equal number ( $4.5 \times 10^6$  per mouse) into primary (I), secondary (II) and tertiary (III) 6-8 weeks old recipient mice (CD45.2<sup>+</sup>) pre-treated, 24h before transplantation, with 30 mg/kg of Busulfan (Busilvex, Pierre Fabre). Chimerism was analyzed by flow cytometry (FACS) and was illustrated by the percentage of donor-derived cells (% CD45.2<sup>+</sup>) found in the BM of recipient mice (related to Fig. 1 D-G).

$Kit^+$  and  $Kit^-$  (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>) B-cells from the BM of pre-leukemic  $PE^{tg}$  mice (CD45.2) were purified and IV transplanted in equal number ( $5 \times 10^4$  per mouse) in primary (I) recipient CD45.1 mice.  $Kit^+$  (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>) B-cells from the BM of wt mice were purified and transplanted ( $5 \times 10^4$  per mouse) as control. BM cells from the primary transplantation with pre-leukemic  $PE^{tg}$   $Kit^+$  et  $Kit^-$  cells were transplanted in secondary (II) recipients (related to Fig. 1 H-I).

Purified D0-2 and D8-9 cells (CD45.2<sup>+</sup>) from CTV-labelled pre-leukemic  $PE^{tg}$  cells were transplanted in equal number ( $2 \times 10^3$  per mouse) in recipient CD45.1 mice (related to Fig. 2 I, J).

Purified GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells from pre-leukemic  $PE^{tg}H2B-GFP^{tg}$  mice (CD45.2<sup>+</sup>) were transplanted in equal number ( $1.5 \times 10^4$  per mouse) in recipient CD45.1 mice (related to Fig. 4 E).

For all transplantation experiments, the number of positive mice and the median of engraftment are indicated. Statistical significance was calculated using an unpaired t test. For Kaplan-Meier survival curves, the median of time required to develop the B-ALL is indicated on the curve.

#### In vitro cell-division assay.

Cell division of  $Kit^+$  (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>) wt and  $PE^{tg}$  B-cells was analyzed by using cell trace violet (CTV) dilution. Briefly, total B-cells ( $10^6$  cells/mL) from wt and pre-leukemic  $PE^{tg}$  mice (30 days-old) were labelled with 5 $\mu$ M CTV (ThermoFisher, C34557) in PBS1X during 20 minutes at 37°C. CTV-labelled B-cells were then washed twice in PBS1X 1% FBS according to the manufacturer recommendations and plated on MS5 stromal cells for 24h to stabilize the staining. Then,  $Kit^+$  (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>) CTV-labelled B-cells were purified by cell sorting and co-cultured for 3 days on MS5 cell line in supplemented B-cell medium. Since dividing cells distribute equally the dye to daughter cells, the number of cell divisions can be followed by the decrease in the fluorescence intensity. Cell division was analyzed using Winlist (Verity Software House) and proliferation index (PI) was calculated as described (Roederer, 2011). Slow- (D0-2) and high- (D8-9) cycling  $PE^{tg}$  cells were purified by cell sorting. High- (D8-9) cycling wt cells were also purified as control to perform the subsequent functional and molecular experiments as indicated in the experimental procedure detailed in Fig. 2 D.

#### In vivo cell-division assay.

Wt or homozygous  $PE^{tg}$  mice were bred with homozygous  $H2B-GFP^{tg}$  mice to obtain heterozygous  $H2B-GFP^{tg}$  and  $PE^{tg}H2B-GFP^{tg}$  mice, respectively. To induce  $H2B-GFP$  transgene expression, 20 days-old mice were intraperitoneally treated with 40mg/kg of doxycycline (DOX, Sigma, D9891) and 2mg/mL of DOX, supplemented with sucrose (Sigma, S9378) at 10 mg/mL, was added to drinking water for 5 weeks (DOX pulse). GFP expression in all B-cell subpopulations was then examined following withdrawal of doxycycline (DOX chase) for 0, 1, 2 and 3 weeks. Quantification of GFP was determined for each time point by ranking  $10^4$  wt or  $PE^{tg}$  cells from the lowest to the highest value of their GFP fluorescence intensity and area under the curve (AUC) was then calculated. White and black dotted lines indicate the standard error of the mean (SEM) of wt and  $PE^{tg}$  AUC, respectively. The proportion of persisting GFP-retained (GFP<sup>high</sup>) cells is indicated for each time point (related to Fig. 4 B, C). Purification of GFP<sup>high</sup>, GFP<sup>med</sup> and GFP<sup>low</sup> B-cells was performed after 1 week of DOX chase using a MoFlo Astrios cell sorter (Beckman Coulter).

#### Phosphoflow cytometry.

Phosphoflow cytometry experiments are related to Fig. 3 B-C and Fig. S3 A to explore IL7r and pre-BCR signaling pathways in pre-leukemic B-cells. As shown in Fig. 3 A, IL7r signal induces Stat5 phosphorylation that activates the transcription of *Cdkn2a*, *IL2ra*, *Tnfrsf13b* and *Socs3* to promote cell survival and proliferation. In parallel, IL7r activates PI3K signaling pathway that phosphorylates and



represses Foxo1, the inducer of *Rag1* and *Rag2* gene transcription, therefore inhibiting *Igκ* gene recombination. In contrast, pre-BCR signal induces Syk/Blnk/Plcγ2 phosphorylation cascade that converges to the transcription of *Ikzf3* and *Irf8* that inhibit pre-B cell proliferation and initiate *Igκ* gene recombination, respectively. Together, each receptor has antagonistic and balanced functions to coordinate the proliferation and differentiation switch in pre-B cells.

1.5x10<sup>6</sup> cells from each wt and pre-leukemic *PE<sup>ts</sup>* BM were mixed and surface markers were stained in RPMI (Gibco) supplemented with 2% FBS for 10 minutes at 37°C and washed with RPMI (centrifugation 5 minutes; 1200 rpm).

IL7r-ligand stimulation was assessed by phosphoflow cytometry after the *ex vivo* activation of pre-leukemic *PE<sup>ts</sup>* BM cells with IL-7 (+IL-7). Unstimulated (-IL-7) cells were used as control. Normal B-cells and aberrant-B *PE<sup>ts</sup>* cells were distinguished according to the level of B220 expression and pStat5 and pFoxo1 expression was detected by FACS. IL7r-ligand stimulation was performed by incubating the cells with RPMI 2% FBS supplemented or not with 30 ng/mL IL-7 (Peprotech) for 15 minutes at 37°C for the detection of pStat5 and for 16 hours at 37°C for the detection of pFoxo1. For the staining of pStat5, cells were then fixed with pre-warmed Lyse/Fix buffer 1X for 12 minutes at 37°C, washed twice (centrifugation 7 minutes; 500 rpm) in RPMI 2% FBS and permeabilized with cold Perm Buffer III for 30 minutes at 4°C, according the manufacturer's instructions (BD Phosphoflow™). Cells were washed twice in PermWash buffer and the intracellular immunostainings with the anti-pStat5 antibody combined with the anti-Ki67 antibody were performed for 30 minutes at RT, followed by two washes before FACS analysis. For the staining of pFoxo1, cells were fixed and permeabilized with cold CytotfixCytoperm Plus buffer (BD Bioscience) for 24 hours at 4°C and washed twice (centrifugation 7 minutes; 500 rpm) in PermWash buffer (BD Bioscience). The intracellular immunostainings with the anti-pFoxo1 antibody combined with the anti-Ki67 antibody were performed in PermWash buffer for 1 hour at RT, followed by two washes (centrifugation 7 minutes; 500 rpm) before FACS analysis.

(Pre-)BCR stimulation was assessed by phosphoflow cytometry after the *ex vivo* activation of pre-leukemic *PE<sup>ts</sup>* BM cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+). Unstimulated (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-) cells were used as control. Normal B-cells and aberrant-B *PE<sup>ts</sup>* cells were distinguished according to the level of B220 expression and pBlnk and pPlcγ2 expression was detected by FACS. (Pre-)BCR stimulation was performed by incubating the cells with RPMI 2% FBS supplemented or not with 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 minutes at 37°C. Cells were then fixed and permeabilized with cold CytotfixCytoperm Plus buffer (BD Bioscience) for 45 minutes at 4°C and washed twice (centrifugation 7 minutes; 500 rpm) in PermWash buffer (BD Bioscience). The intracellular immunostainings with the anti-pBlnk or the anti-pPlcγ2 antibodies combined with the anti-Ki67 antibody were performed in PermWash buffer for 30 minutes at RT, followed by two washes (centrifugation 7 minutes; 500 rpm) before FACS analysis. Immunostaining combinations used for the phosphoflow cytometry are listed in [Table S1](#).

#### Human B-ALL samples.

Human B-ALL samples were obtained from the Toulouse University Hospital (TUH) (Toulouse, France) after signed written informed consent for research use in accordance with the Declaration of Helsinki and stored at the HIMIP collection (BB-0033-00060). According to the French law, HIMIP biobank collection has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307, collection 1) and obtained a transfer agreement for research applications (AC 2008-129) after approbation by our institutional review board and ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II). Biological annotations of the samples have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés, i.e., Data Processing and Liberties National Committee). For *in vitro* cell-division assay using CTV dilution, human B-ALL blasts (HB#002 and HB#008) were stained as previously described and CTV-labelled cells were grown in co-cultured on MS5 cell line in supplemented B-cell medium and analysed at the indicated time points in the [Fig. 6 J](#) and [Fig. S5I](#).

#### Patient-Derived Xenografted Model and *in vivo* treatment with chemotherapy

NSG mice were produced at the Génotoul-Anexplor platform at Toulouse, France, using breeders obtained from Charles River Laboratories. Mice were housed in sterile conditions using high-efficiency particulate arrestance filtered microisolators and fed with irradiated food and sterile water. Mice (6–9 weeks old) were sub-lethally treated with busulfan 30 mg/kg 24 h before injection of leukemic cells. Leukemic blasts from B-ALL patients were thawed at room temperature, washed twice in PBS and

transplanted by intravenous injection ( $2 \times 10^5$  cells per mouse). At the indicated time points in Fig. 6 D and Fig. S6 C, leukemia engraftment was monitored by FACS with hCD45 (BD Bioscience, 557748) and hCD19 (BD Bioscience, 562294) staining after BM punctures. For combination therapy, a chemotherapeutic cocktail composed of Dexamethasone (DEXA, 10 mg/kg) and Vincristine (VCR, 0.5 mg/kg) was administered weekly for 3 weeks (HB#010; Fig. 6 C) and for 1 week (HB#007; Fig. S6 B) via intraperitoneal injection. A daily administration of 10 mg/kg DEXA was supplemented during the period of treatment. Mice were euthanized and analysed after the treatment.

#### RT-qPCR

RNA was isolated using Trizol method and cDNA was synthesized using SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen™) according to the manufacturer's instructions. Quantitative SYBR Green PCR was performed on a LightCycler®480 II System (Roche) to quantify human *EGR1* cDNAs expression in Fig. 6 H, K and Fig. S6G, J using LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH) according to the manufacturer's instructions. All PCR were carried out as follows in a 20 µl volume: 5 min at 95°C, followed by 45 cycles of 10 s at 95°C, 10 s at annealing temperature of 60°C and 10 s at 72°C. Quantification was performed using the  $\Delta Ct$  method with normalization to the human *ABL1* gene expression levels. Data were analyzed using the LC480 software (Roche Diagnostics). The forward (Fw) and reverse (Rv) primers used were as follows: for *EGR1* (Fw: 5'-CAGCCCTACGAGCACCTGAC-3' and Rev: 5'-GTGGTTTGGCTGGGGTAACT-3'); for *ABL1* (Fw: 5'-TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3' and Rev: 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3').

#### Statistical analysis.

The number of biological replicates is indicated in the relevant figure legends. Error bars for pooled replicates represent standard deviation (SD). Statistical differences were determined using a two-tailed unpaired Student's t test for comparison of quantitative variable, assuming normality and equal distribution of variance between the different groups analyzed. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software, version 7 (GraphPad). A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001). Survival in mouse experiments was represented with Kaplan-Meier curves (GraphPad Prism).

#### RNA-sequencing.

RNA from purified *PE*<sup>tg</sup> D0-2 and D8-9 cells and from wt D8-9 cells was isolated with the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). RNA-seq libraries were prepared using TruSeq Stranded mRNA Low Sample kit (Illumina) according to manufacturer's protocol, starting with 300 ng mRNA. Cluster generation and sequencing were carried out by using the Illumina NEXTSEQ 550 system and NEXTSEQ 500/550 HIGH OUTPUT KIT v2.5 (150 cycles) with a read length of 2 x 75 nucleotides according to the manufacturer's guidelines. The expression of mRNA transcripts rearranged for the *IgH* and *IgL* loci was analysed using *Mixcr* software and represented by Circos diagrams using *VDJ tool* software.

#### ULI RNA-sequencing.

GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells from the aberrant-B population of pre-leukemic *PE*<sup>tg</sup>*H2B-GFP*<sup>tg</sup> mice after 1 week of DOX chase were purified by cell sorting (Melody, BD) directly in RLT buffer and the RNA was isolated with the RNeasy plus micro kit (Qiagen). Smart-seqv4 libraries were prepared as previously described (Picelli et al., 2014) using the Takara SMART-Seq v4 full-length transcriptome analysis kit according to the manufacturer's guidelines. Paired-end sequencing was performed on an Illumina NextSeq 500 using 2 x 75 bp reads. Low quality reads were trimmed and adaptor sequence was removed using fastp (v). Short reads were then mapped to mm10 genome using RNA-STAR (v2.7.8a) with doublepass parameter. Low quality mapping and duplicated reads were removed and the remaining reads was count using featurecount (v) with default paired-end parameter.

GSEA of top 500 differentially-expressed genes (bulk RNA-seq [EGAD00001006133](#)) of residual human B-ALL cells after chemotherapies published in (Turati et al., 2021) (corresponding to acutely treated vs untreated PDX from patient 2) was performed in pre-leukemic *PE*<sup>tg</sup>*H2B-GFP*<sup>tg</sup> (Fig. 5 C).

For the integration of the Immgen database, the same pre-processing pipeline was used for all the Immgen fastq ([GSE109125](#)) excepted that the reads of the *PE*<sup>tg</sup>*H2B-GFP*<sup>tg</sup> samples were trimmed to 25

bp to match the Immgen reads length and avoid mappability bias. The ComBat function in the sva R package was used to correct the batch effect between our and Immgen samples. Regularized log-transformed (rlog) values were calculated by DESeq2, used to calculate k-means and perform our integrative approach.

#### ATAC-seq libraries generation and processing.

Sorted  $PE^{\text{tg}}H2B-GFP^{\text{tg}}$  populations were prepared according to (Buenrostro et al., 2013) using ATAC-Seq kit (Active-motif, #53150). The size distribution and concentration of the libraries were assessed on TapeStation with a DNA High Sensitivity kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Paired-end 37.5 bp sequences were generated from samples on an NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA), generating an average of 125 millions of reads per sample.

First, FastQC is used to assess the sequence quality. Foreign sequences removal and trimming are realised with Sickle (qual threshold 20 and length threshold 20). Sequences were mapped to the murine genome with Bowtie2 (2.4.2) (Langmead and Salzberg, 2012) with -X 2000 (maximal fragment length), very-sensitive and against mm10. Next, we performed various cleaning steps according to (Berest et al., 2019): in brief, removing mitochondrial reads, filtering reads with mapping quality <20, removing duplicate reads and adjusting read start sites as described previously (Buenrostro et al., 2013) (+4 -5). Lastly, a GC bias diagnosis and correction using deepTools was run for each sample. The output of this pre-processing pipeline was used to peak calling using MACS2 with -SE -200 -100 -lambdafix parameter and removal of blacklisted regions.

#### diffTF and HINT-atac analysis.

The complete diffTF pipeline (Berest et al., 2019) was run using TF binding sites (TFBS) generated by PWMscan analysis (cutoff p-val: - 0.00001, background base composition: - 0.29;0.21;0.21;0.29) of each JASPAR2020 PWMs motifs to obtain position of 644 non redundant and specific motifs. The analytical approach was preferred due to the small size of the sample and paired design was used for DeSeq2 parameter. For the plotting of individual activity for each TF we used Hint-atac pipeline (Li et al., 2019) with standard parameter on the combination of the bam for each condition to scan the JASPAR2020 database.

Fastq ATAC-seq data of interest from Immgen Database was extracted from GSE100738, pre-process as described previously and the totality of the reads from all samples was normalized together using local loess normalization as described in (Reske et al., 2020) with csaw package. Finally, to represent pile-up traces of the integrated data, Becorrect (Gontarz et al., 2020) was used on each bedgraph file with their corresponding normalized counts.

#### Transcriptional regulatory network inference.

Peaks were associated with putative transcription-factor binding events and target genes to generate a prior network:  $P\&R^{\text{genes}} \times |\text{TFs}|$  of TF-gene interactions. We used vertebrate motifs from JASPAR2020 to scan the differential  $PE^{\text{tg}}H2B-GFP^{\text{tg}}$  peaks, running construct\_atac\_prior.R script (p-val cutoff =  $10^{-5}$ ; window\_feature = 25kb; background set as A=0.29, C=0.21, G=0.21, T=0.29). We built gene expression models according to (Miraldi et al., 2019) and included our study a target gene expression matrix containing the 1625 core  $PE^{\text{tg}}H2B-GFP^{\text{tg}}$  genes for a total of 26 samples : LT-HSC (n=2), MPP1 (n=2), ST-HSC (n=2), MPP4 (n=2), CLP (n=2), FrA (n=2), FrBC (n=2), FrE (n=2), H2B<sup>high</sup> (n=5) and H2B<sup>low</sup> (n=5). We considered 275 potential TF regulators corresponding to most variable TFs across the samples. The parameters used was: moderate prior reinforcement ( $\lambda_{\text{bias}} = 0.05$ ), 50 subsamples of size  $0.90 \times |\text{samples}|$ , instability cutoff of 0.05 to solve the TF-gene interactions. The prediction based on TF mRNA levels (1) and on prior target genes (2), our  $PE^{\text{tg}}H2B-GFP^{\text{tg}}$  TRN size was set to an average of 15 TFs per gene and result to a total of 24 275 TF-gene interactions.

#### **Author contributions**

VF designed the study, performed and analysed the experiments and wrote the manuscript. MBa, MBo, LL, CH, LJ, NP, SL, SH, IL, VMDM and MN performed experiments. MP, AAK, CD, CB, ED and SM reviewed the data and the manuscript. BG performed and analysed experiments, conceived and supervised the project and wrote the manuscript. All authors contributed to the final draft.

### **Acknowledgments**

We acknowledge Pr. Tariq Enver and Pr. Javier Herrero for having shared their molecular data published in (Turati et al., 2021). We acknowledge Manon Farcé from the cytometry and cell sorting facility of the Cancer Research Center of Toulouse (INSERM U1037) and the Anexplo/Genotoul platforms (UMS006) for technical assistances. This study was supported by institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, France), France, from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), the Institut National du Cancer, France (INCa-2020-096, France), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE13-0002-01, France) and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (PJA-20181207977, France). The team is supported by the Ligue Contre le Cancer and the associations “Laurette Fugain”, “111 des arts”, “Cassandra” and “Constance la petite guerrière astronaute”.

### **Declaration of interests**

The authors declare no competing interests.

Figure 1.

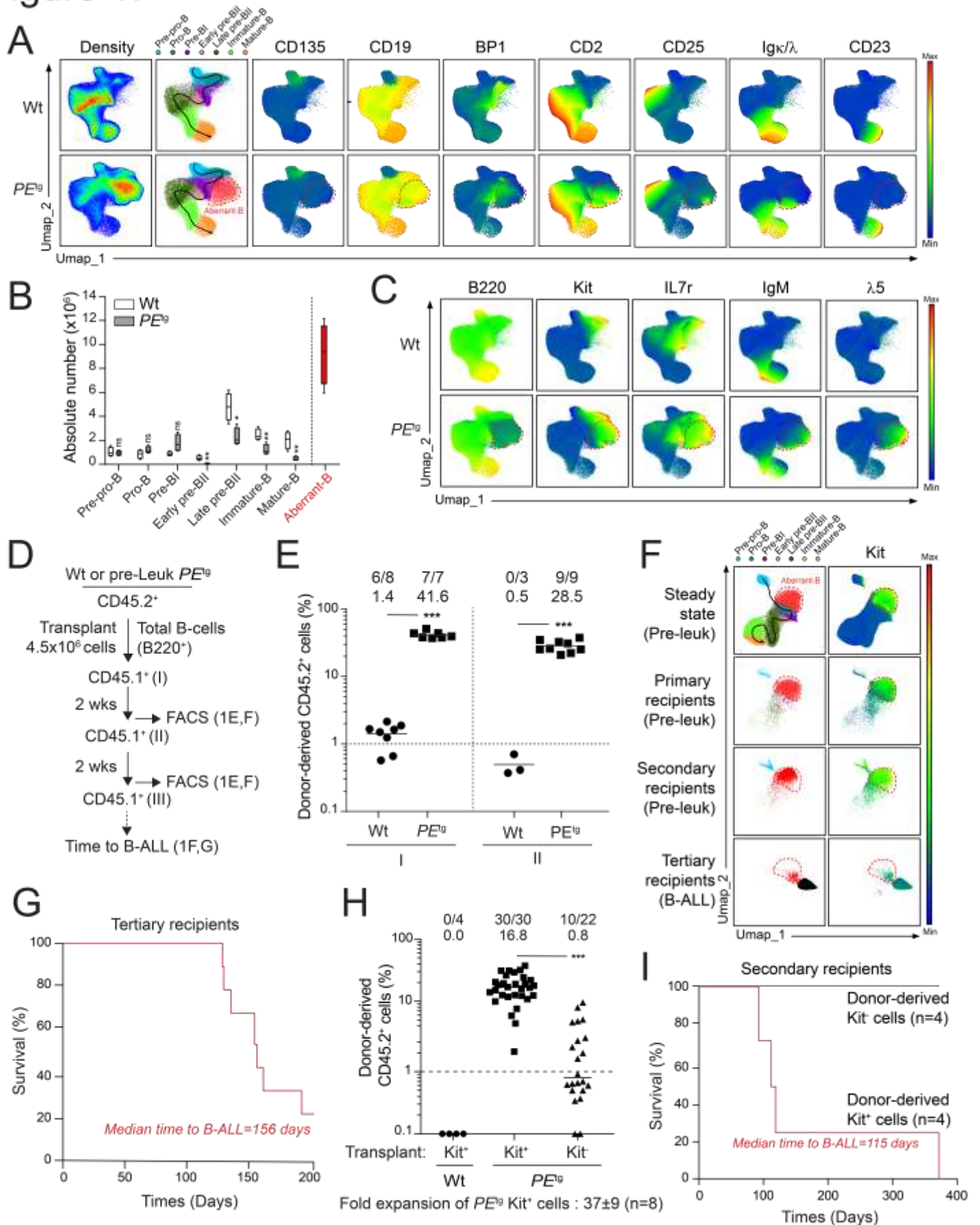


Figure 2.

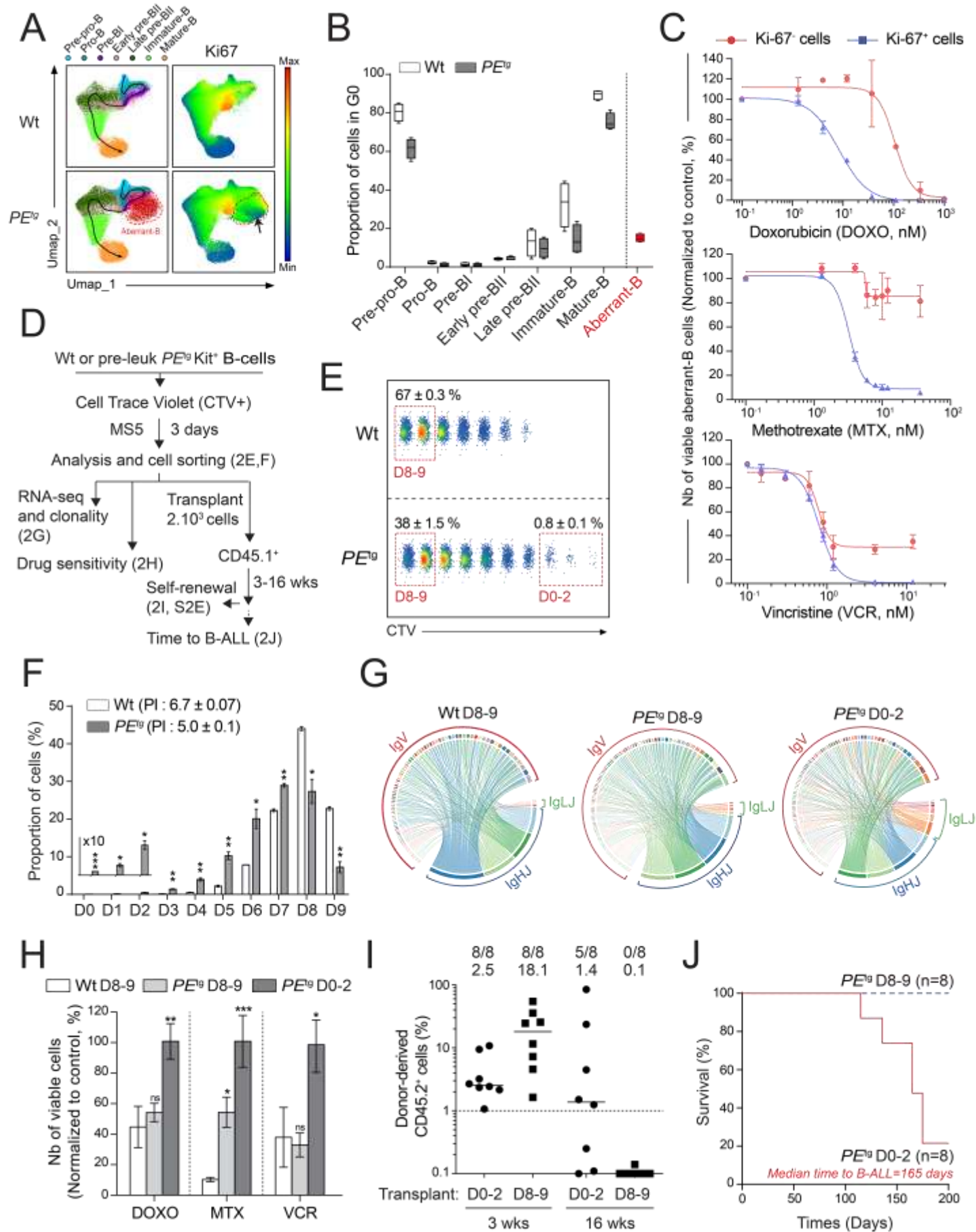


Figure 3.

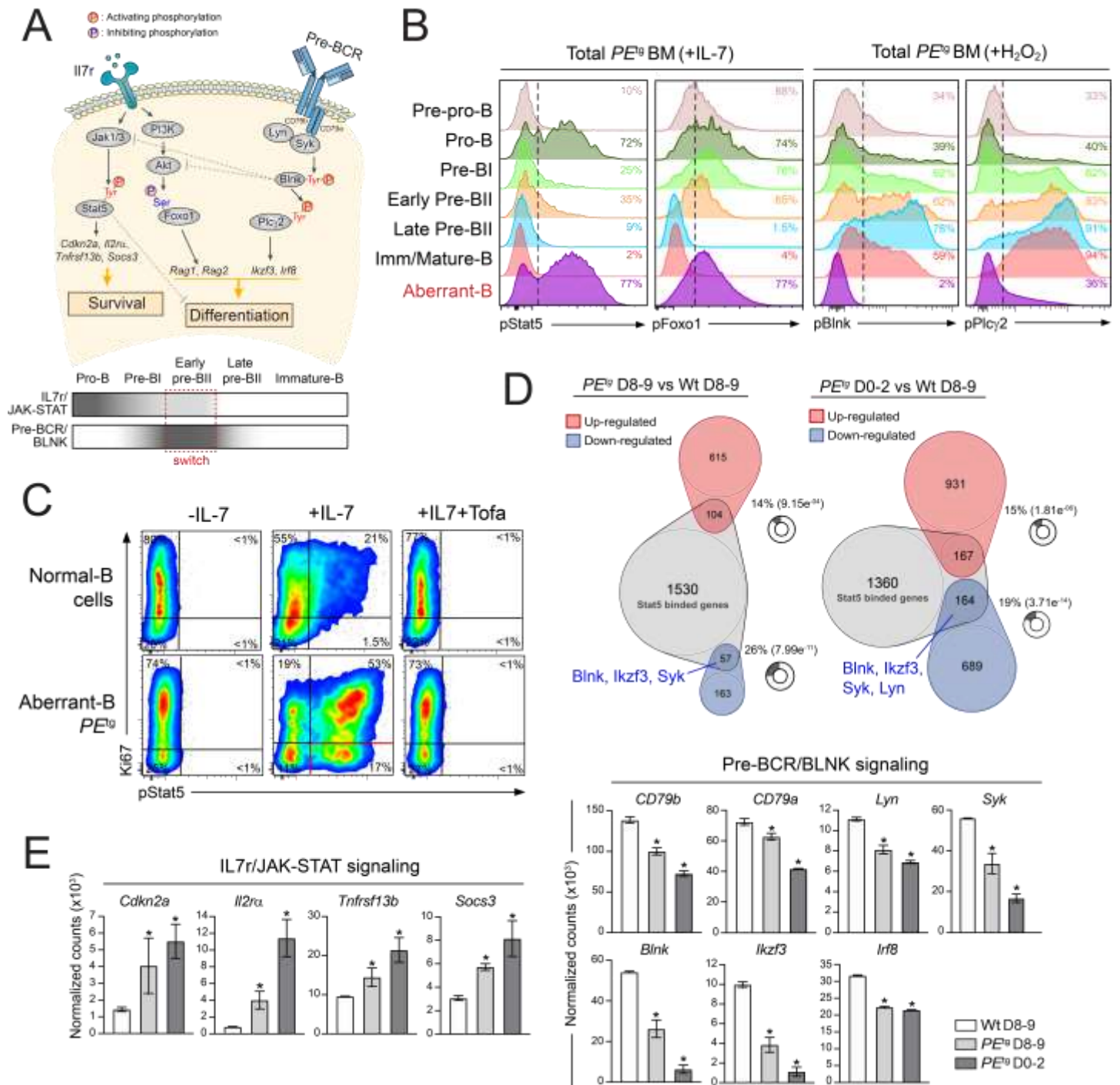


Figure 4.

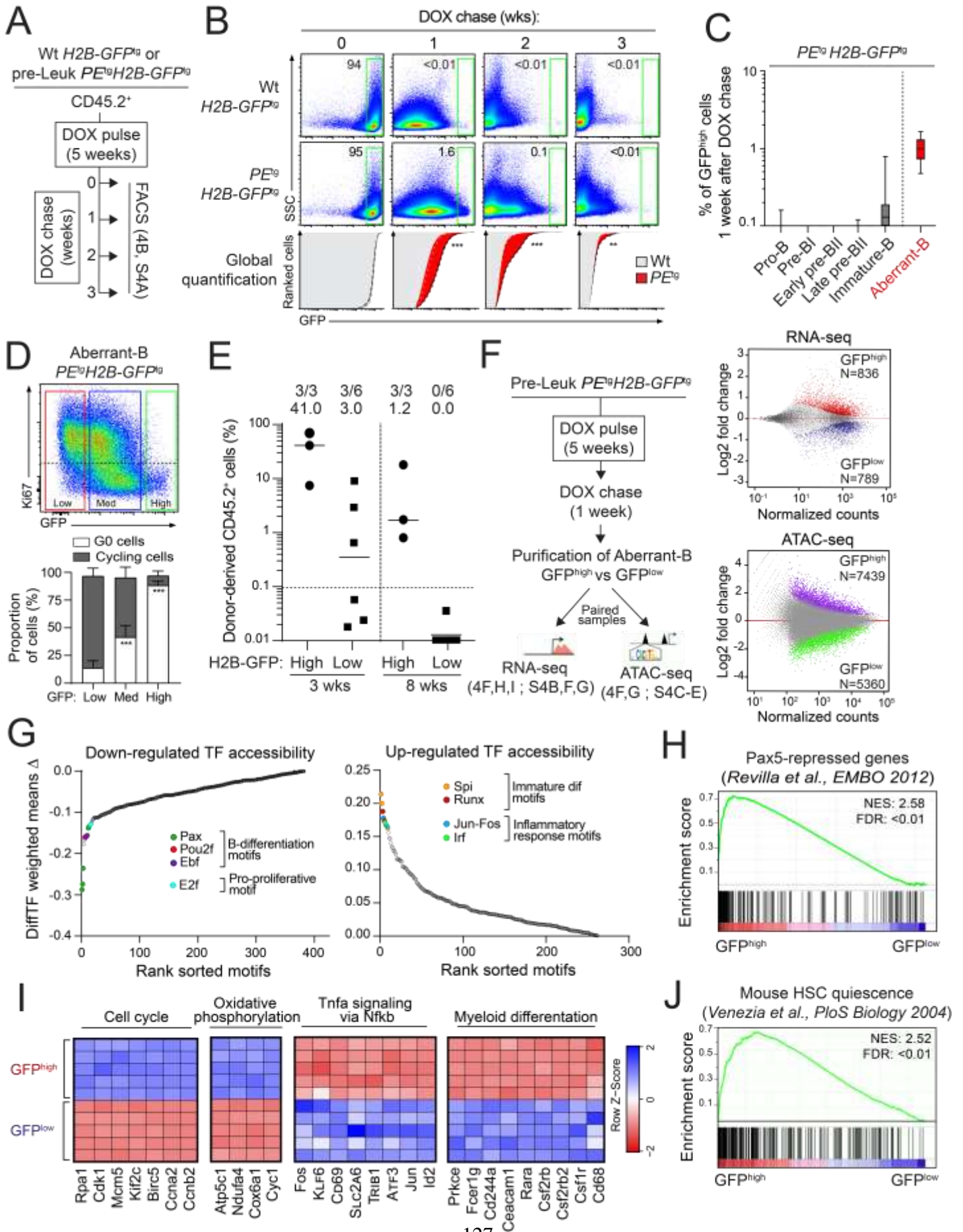




Figure 5.

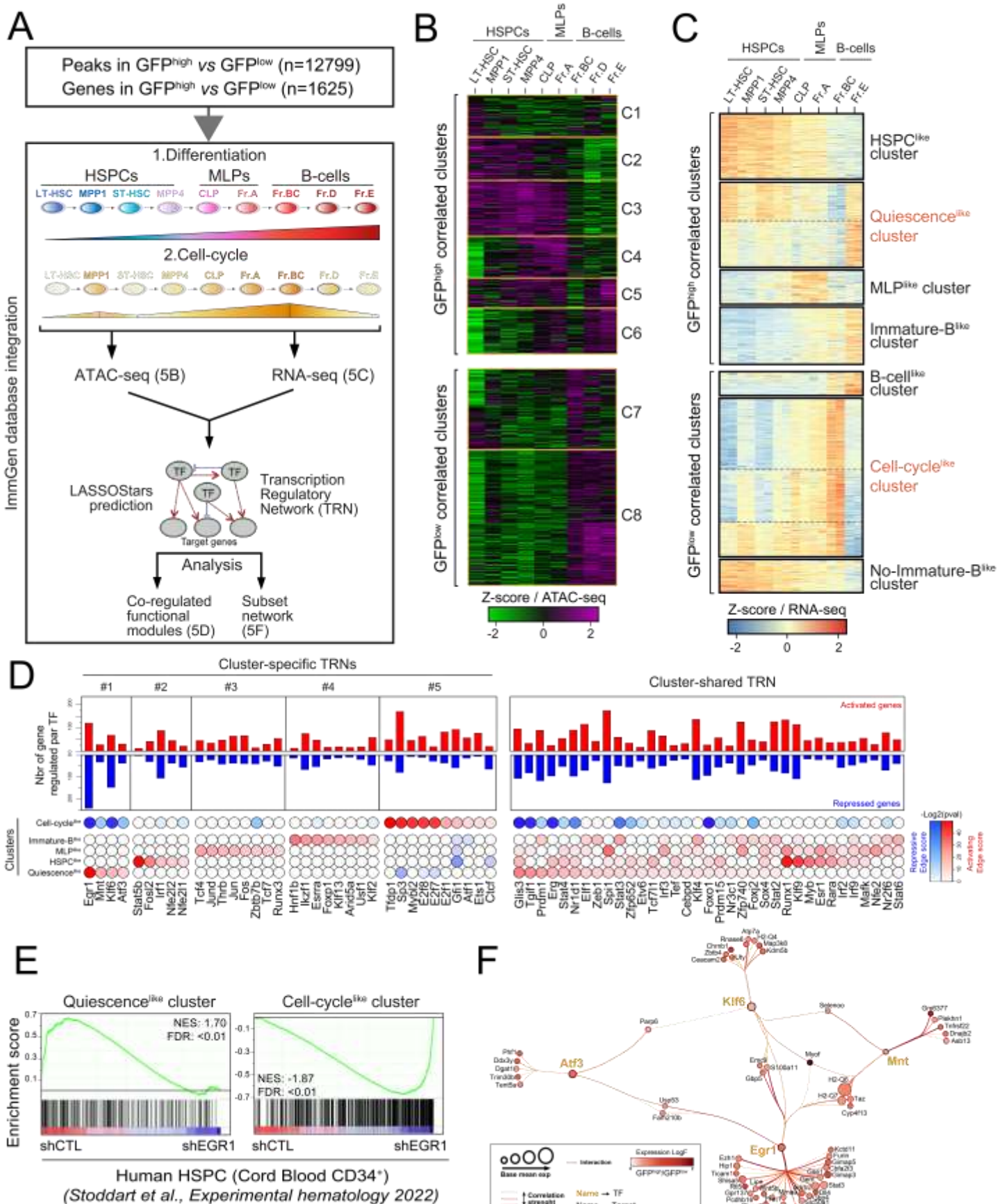
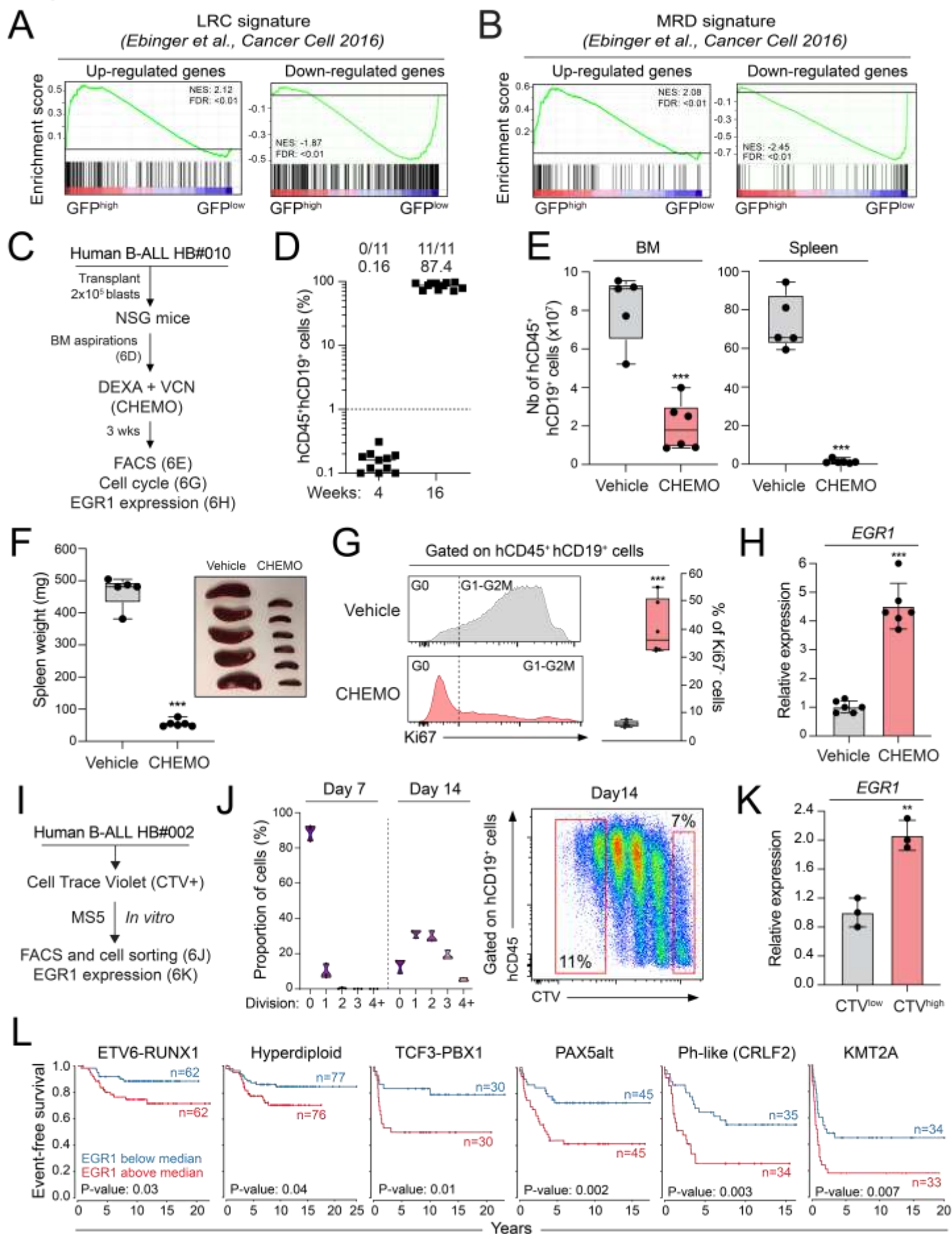


Figure 6.



### Figure legends.

#### Fig. 1: PAX5::ELN induces aberrant B-cells at the pre-leukemic stage.

(A-C) Phenotypic characterization of the B-cell lineage from the bone marrow (BM) of wt and PAX5::ELN ( $PE^{tg}$ ) pre-leukemic mice (30 days-old, n=4). UMAP of the cell density (A, *left panel*), of the clustering analysis of the B-cell subpopulations (A, *central panel*) based on the gating strategy shown in Fig. S1 B and C, associated with the expression level of CD135, CD19, BP1, CD2, CD25, Ig $\kappa/\lambda$  and CD23 (A, *right panel*). Absolute numbers of B-cell subpopulations were calculated (B). UMAP of the expression level of B220, Kit, IL7r, IgM and  $\lambda 5$  (C).

(D) Experimental procedure to study the functional impact of PAX5::ELN on B-cells.

(E) Engraftment efficiency in the recipient BM of primary (I) and secondary (II) mice was analyzed each 2 weeks after transplantation.

(F) UMAP of the CD45.2<sup>+</sup>  $PE^{tg}$  B-cell subpopulations (*left panel*) before (steady state) and after transplantation in primary, secondary and tertiary recipients, associated with the expression level of Kit (*right panels*).

(G) Kaplan-Meier survival curve of tertiary recipients transplanted with donor-derived  $PE^{tg}$  B-cells.

(H) Engraftment efficiency in the recipient BM of primary mice was analyzed 3 weeks after transplantation.

(I) Kaplan-Meier survival curve of secondary recipient mice respectively transplanted with donor-derived Kit<sup>+</sup> cells (red) or Kit<sup>-</sup> cells (blue).

#### Fig. 2: Cell quiescence is a feature of PAX5::ELN pre-LSCs.

(A-B) UMAP representation of the wt and  $PE^{tg}$  B-cell subpopulations (A, *left panel*), associated with the Ki67 expression level (A, *right panel*). The arrow indicates the population in G0 phase (Ki67<sup>-</sup> cells in blue) within the aberrant-B cell population. Quantification of the proportion of cells in G0 phase (Ki67<sup>-</sup> cells) within each wt and  $PE^{tg}$  B-cell subpopulation (B).

(C) Pre-leukemic  $PE^{tg}$  cells were treated *in vitro* on MS5 stromal cells with a dose-response of Doxorubicine (DOXO), Methotrexate (MTX) or Vincristin (VCR) for 48 hours. Absolute numbers of Ki67<sup>+</sup> and Ki67<sup>-</sup> cells within the aberrant-B cell population was then analyzed by FACS and normalized to the number of untreated cells.

(D) Experimental procedure to study cell-division of Kit<sup>+</sup> B-progenitors from wt and pre-leukemic  $PE^{tg}$  mice.

(E-F) The number of cell divisions (D0 to D9) after the co-culture was then analyzed (E), the proportion of cells in each division was quantified and the proliferation index (PI  $\pm$  SD) was calculated for each condition (F, n=2). Red dotted gates were used to purify the D0-2 and D8-9 populations (E).

(G) Cell clonality analysis of  $PE^{tg}$  D0-2,  $PE^{tg}$  D8-9 and wt D8-9 populations after RNA-sequencing. The proportions of V<sub>H</sub>(D<sub>H</sub>)J<sub>H</sub> and V<sub>L</sub>J<sub>L</sub> rearranged transcripts were represented by Circos diagrams.

(H) Drug sensitivity of  $PE^{tg}$  D0-2 and D8-9 cells and of wt D8-9 cells upon the treatment with an IC50 of DOXO, MTX and VCR during 48 hours (n=3).

(I-J) Engraftment efficiency 3 and 16 weeks after transplantation (I) and Kaplan-Meier survival curve of recipient mice transplanted with D0-2 and D8-9  $PE^{tg}$  cells (J).

#### Fig. 3: Imbalance of IL7r/JAK-STAT and pre-BCR/BLNK pathways in PAX5::ELN pre-leukemic cells.

(A) Simplified schematic representation of the IL7r and pre-BCR signaling pathways adapted from (Clark et al., 2014).

(B) FACS analysis of pStat5 and pFoxo1 on the aberrant-B cell population and on each normal B-cell subsets from pre-leukemic  $PE^{tg}$  mice after *ex vivo* IL-7 stimulation (+IL-7) (*left panels*). FACS analysis of pBlnk and pPlc $\gamma$ 2 after *ex vivo* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation (+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was shown in *right panels*.

(C) Representative FACS analysis of pStat5 after IL-7 stimulation (+IL-7) in presence or not (vehicle) of 1 $\mu$ M Tofacitinib associated with Ki67 expression in normal B-cells and in aberrant-B  $PE^{tg}$  cells. Unstimulated (-IL-7) were used as controls.

(D) Venn diagram of PAX5::ELN-modified genes overlapped with a list of Stat5-binding genes arising from the ChIP-sequencing of murine *Stat5b*-induced B-ALL cells (Katerndahl et al., 2017). Numbers in plot indicate quantification of genes in each group. Indicated p-value was calculated by hypergeometric test.

(E) Expression level of selected genes involved in IL7r/JAK-STAT (*left panel*, *Cdkn2a*, *Il2ra*, *Tnfrsf13b* and *Socs3*) and in pre-BCR/BLNK (*right panel*, *CD79b*, *CD79a*, *Lyn*, *Syk*, *Blnk*, *Ikzf3* and *Irf8*) signaling pathways extracted from the RNA-sequencing of *PE*<sup>tg</sup> D0-2, *PE*<sup>tg</sup> D8-9 and wt D8-9 cells.

#### **Fig. 4: Loss of B-cell molecular identity in quiescent pre-LSCs.**

- (A) Experimental procedure to study the cell-division kinetic *in vivo* of wt and pre-leukemic B-cells.
- (B) Representative FACS analysis of GFP expression in B-cells (CD19<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>) from the BM of wt *H2B-GFP*<sup>tg</sup> (n=14, *upper panels*) and pre-leukemic *PE*<sup>tg</sup>*H2B-GFP*<sup>tg</sup> (n=12, *central panels*) mice after 0, 1, 2 and 3 weeks of DOX chase. AUC quantification of the GFP was compared between the two conditions (*lower panels*).
- (C) Quantification of the proportion of GFP<sup>high</sup> within pre-leukemic *PE*<sup>tg</sup>*H2B-GFP*<sup>tg</sup> (n=12) B-cell subpopulations after one week of DOX chase.
- (D) Representative FACS analysis (*upper panel*) and quantification (*lower panel*, n=8,) of the proportion of G0 (ki67<sup>-</sup>) and cycling (Ki67<sup>+</sup>) cells in GFP<sup>low</sup>, GFP<sup>med</sup> and GFP<sup>high</sup> populations.
- (E) Engraftment efficiency of purified GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells from *PE*<sup>tg</sup>*H2B-GFP*<sup>tg</sup> mice was analyzed by FACS 3 and 8 weeks after transplantation.
- (F) Experimental procedure for the molecular characterization of quiescent pre-LSCs *in vivo* (*left panel*). Scatter plots showing differentially expressed genes (RNA-seq) and differentially chromatin accessibility (ATAC-seq signal) between purified GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells from *PE*<sup>tg</sup>*H2B-GFP*<sup>tg</sup> mice (*right panels*).
- (G) TF motifs with differential chromatin accessibility between GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells identified and sorted using the DiffTF computational tool (Berest et al., 2019). Down- (*left panel*) and up- (*right panel*) regulated TF accessible regions in quiescent GFP<sup>high</sup> cells were represented.
- (H) GSEA of the well-established list of *in vivo* PAX5-repressed genes (Revilla et al., 2012) between GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells.
- (I) Heatmap of genes involved in indicated pathways.
- (J) GSEA of the established list of *in vivo* mouse HSC quiescence genes (Venezia et al., 2004) between GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells.

#### **Fig. 5: Transcriptional molecular network reprogrammed in quiescent pre-LSCs.**

- (A) Study design for the generation of the pre-LSC transcription regulatory network.
- (B-C) Heatmap of k-means clustering for the differentially accessible region (B) or differentially expressed genes (C) integrating the different subsets of the normal B-lymphopoiesis. Cluster are separated depending of the correlation with GFP<sup>high</sup> or GFP<sup>low</sup>.
- (D) Core TRNs are defined according to enriched positive regulation of upregulated gene (red) or negative regulation of downregulated genes (blue) in a given cluster identified in Fig. 5 C (*lower panels*). The significance of enrichment is displayed on the right. The *upper panels* displayed the number of positive (red) and negative (blue) regulatory interactions per TF. The analysis defined five cluster-specific TRNs and one cluster-shared TRN of the pre-LSC signature.
- (E) GSEA of the list of genes in the “Quiescence<sup>like</sup> cluster” (*left panel*) and in the “Cell-cycle<sup>like</sup> cluster” (*right panel*) and identified in Fig. 5 C between human CD34<sup>+</sup> HSPCs modified or not (shCTL) with *EGR1* shRNA (shEGR1) (Stoddart et al., 2022).
- (F) Molecular network of genes from TRN#1 of Fig. 5 D. Node colour represents the log-fold difference between GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> subset and node size represents the base-mean expression. Target genes positively regulated by the four TFs Egr1, Mnt, Klf6 and Atf3 were annotated.

#### **Fig. 6: EGR1 activation in quiescent and therapy-resistant human B-ALL.**

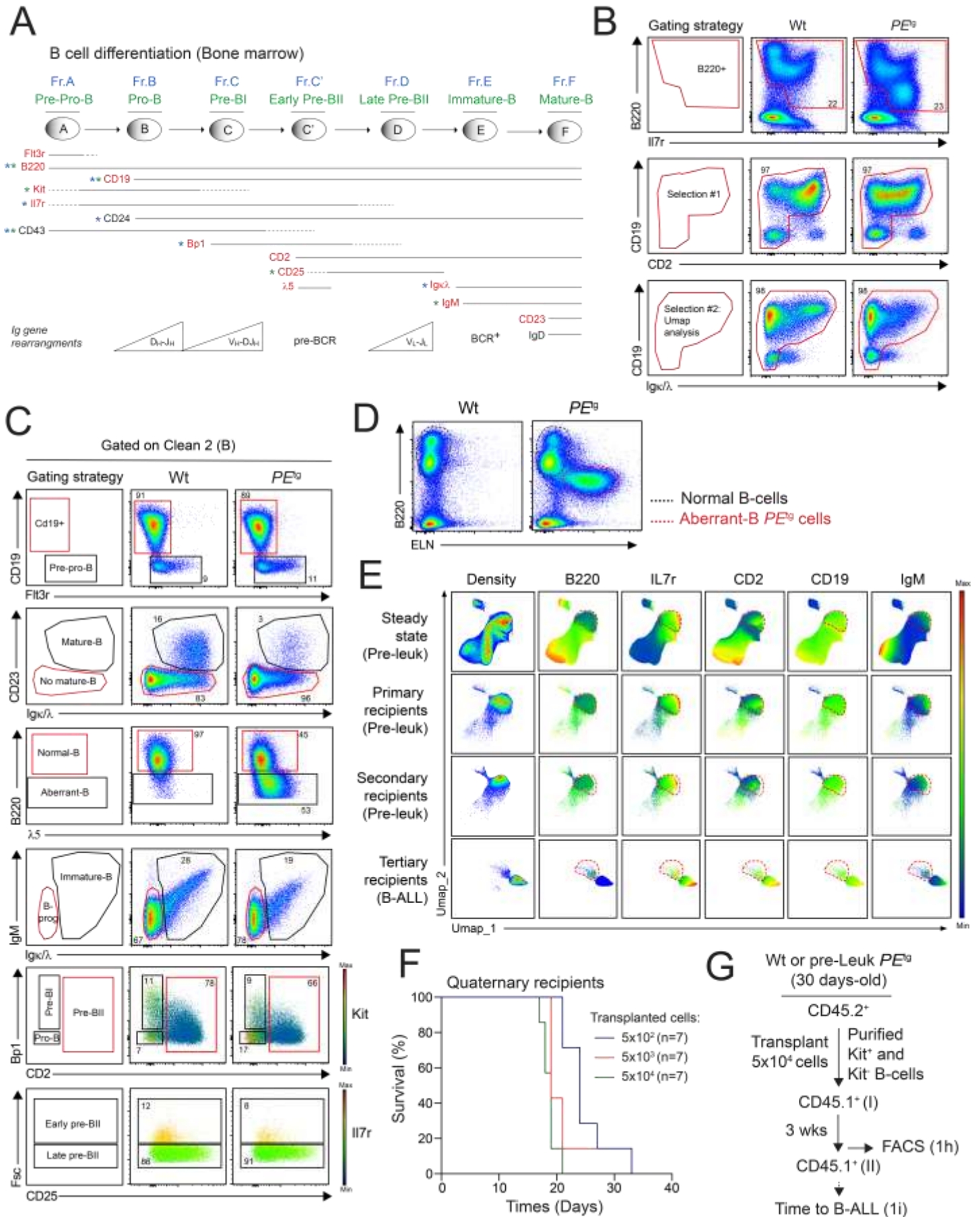
- (A-B) GSEA of the up- (*left panels*) and down- (*right panels*) regulated genes from CFSE label-retaining human B-ALL cells (LRC signature, A) or from residual human B-ALL cells after chemotherapies (MRD signature, B) (Ebinger et al., 2016) between GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells.
- (C-H) Experimental procedure to explore EGR1 expression in resistant human B-ALL cells (C). Leukemic blasts from the “*de novo*” B-ALL patient HB#010 were transplanted into NSG mice (n=11). The proportion of hCD45<sup>+</sup>hCD19<sup>+</sup> B-ALL blasts in BM aspirations was assessed 4 and 16 weeks after transplantation (D). Engrafted mice were randomly selected for treatment (CHEMO, n=6) or not (vehicle, n=5) with a chemotherapeutic cocktail (DEXA+VCN) during 3 weeks. Human B-ALL

reconstitution (number of hCD45<sup>+</sup>hCD19<sup>+</sup> B-ALL blasts) was monitored by FACS in the BM and the spleen after the treatment (E). Spleen weight was measured and picture of the spleen was shown (F). Ki67 expression was determined by FACS in blasts from the BM of treated and untreated mice (G). Engrafted blasts were purified and mRNA levels of the human *EGR1* were determined by quantitative RT-PCR and normalized to *ABL1* gene (H).

(I-K) Experimental procedure to explore *EGR1* expression in quiescent human B-ALL cells (I). Leukemic blasts from the “*de novo*” B-ALL patient HB#002 were stained with CTV and the number of cell divisions (D0 to D4-5) after the co-culture was then analyzed (J). The proportion of cells in each division was quantified (J, *left panel*). Red dotted gates were used to purify the D0 (CTV<sup>high</sup>) and D4-5 (CTV<sup>low</sup>) populations (J, *right panel*) and the expression of human *EGR1* were determined by quantitative RT-PCR (K).

(L) *EGR1* expression and its associated clinical outcome in B-ALL patient extracted from (Gu et al., 2019). Event-free survival (EFS) curves of B-ALL patients with *EGR1* expression below (blue) and above (red) to the median. Patients are classified within the different B-ALL oncogenic subgroups.

Figure S1.



# Figure S2.

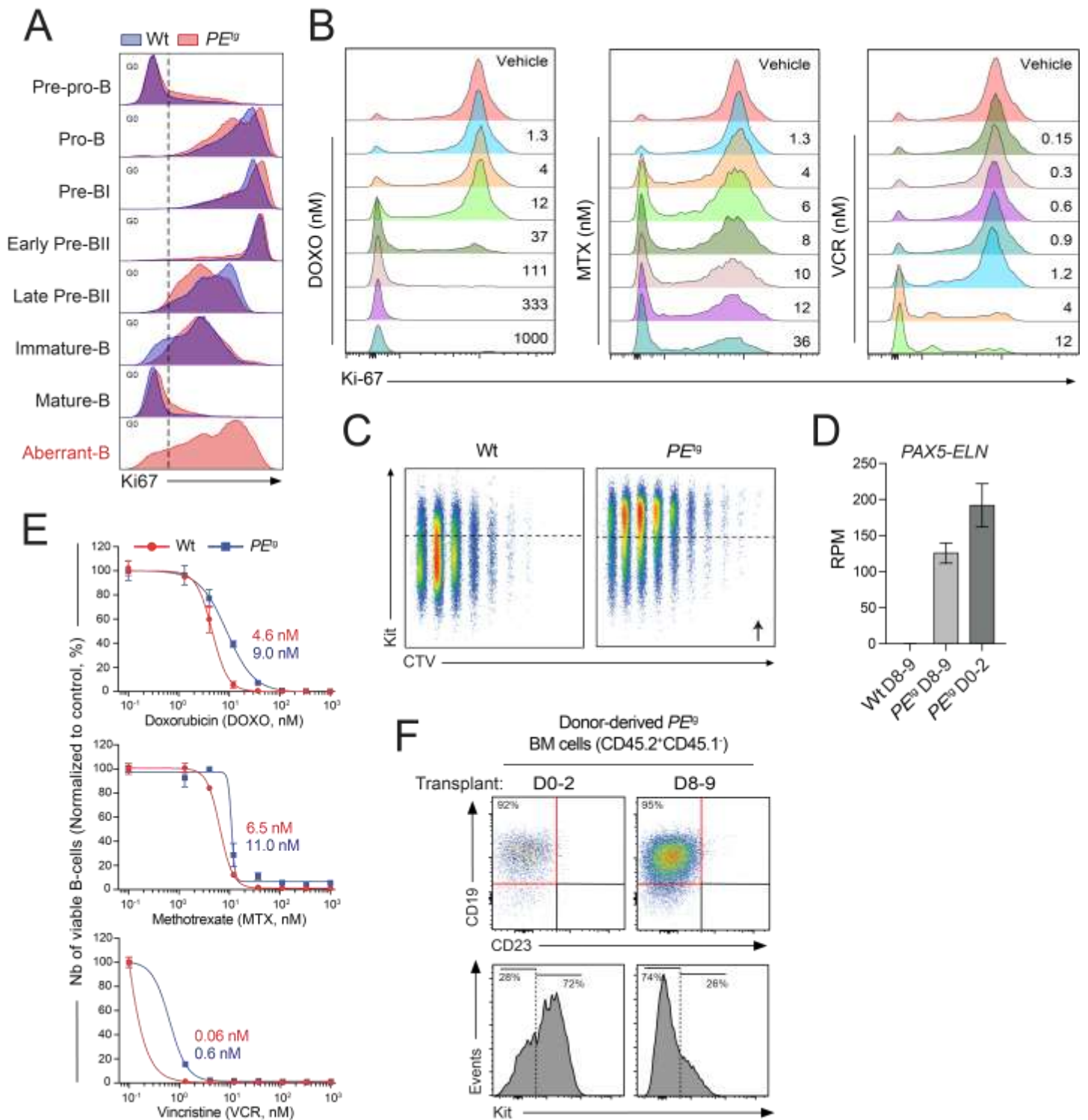


Figure S3.

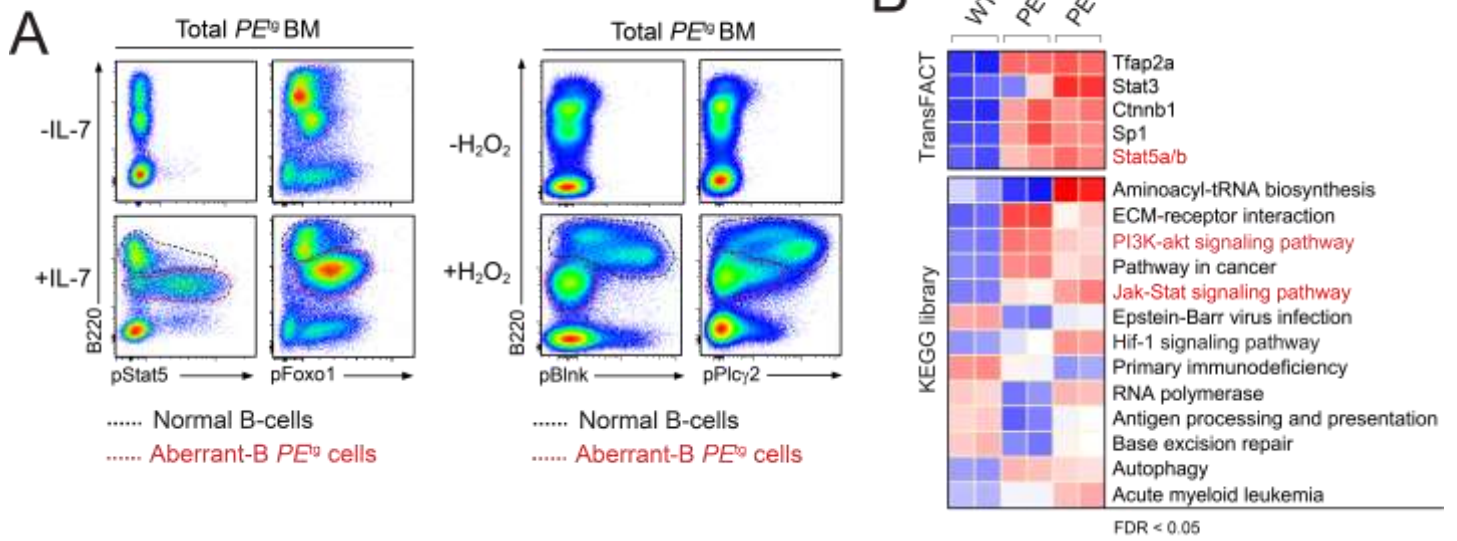




Figure S4.

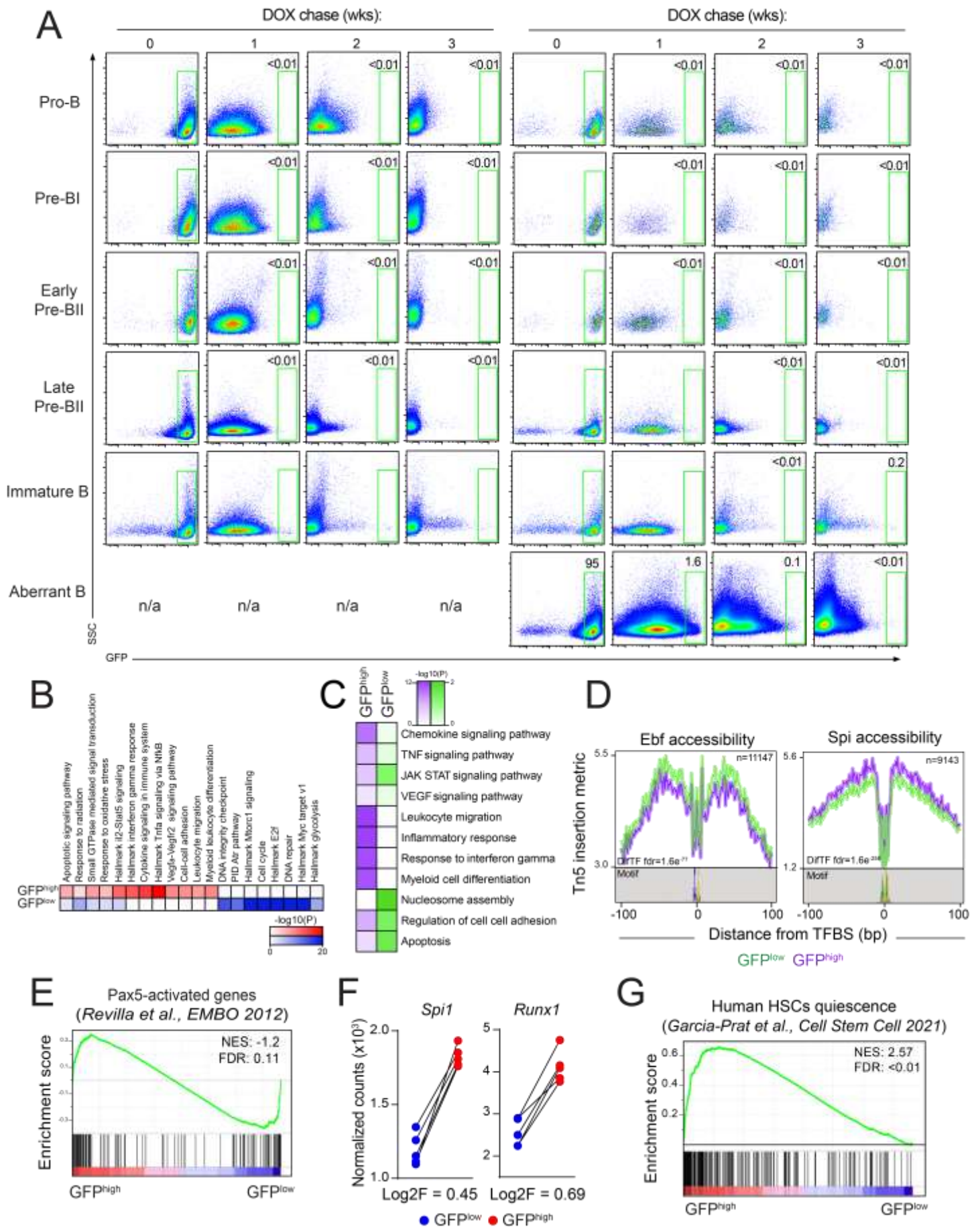
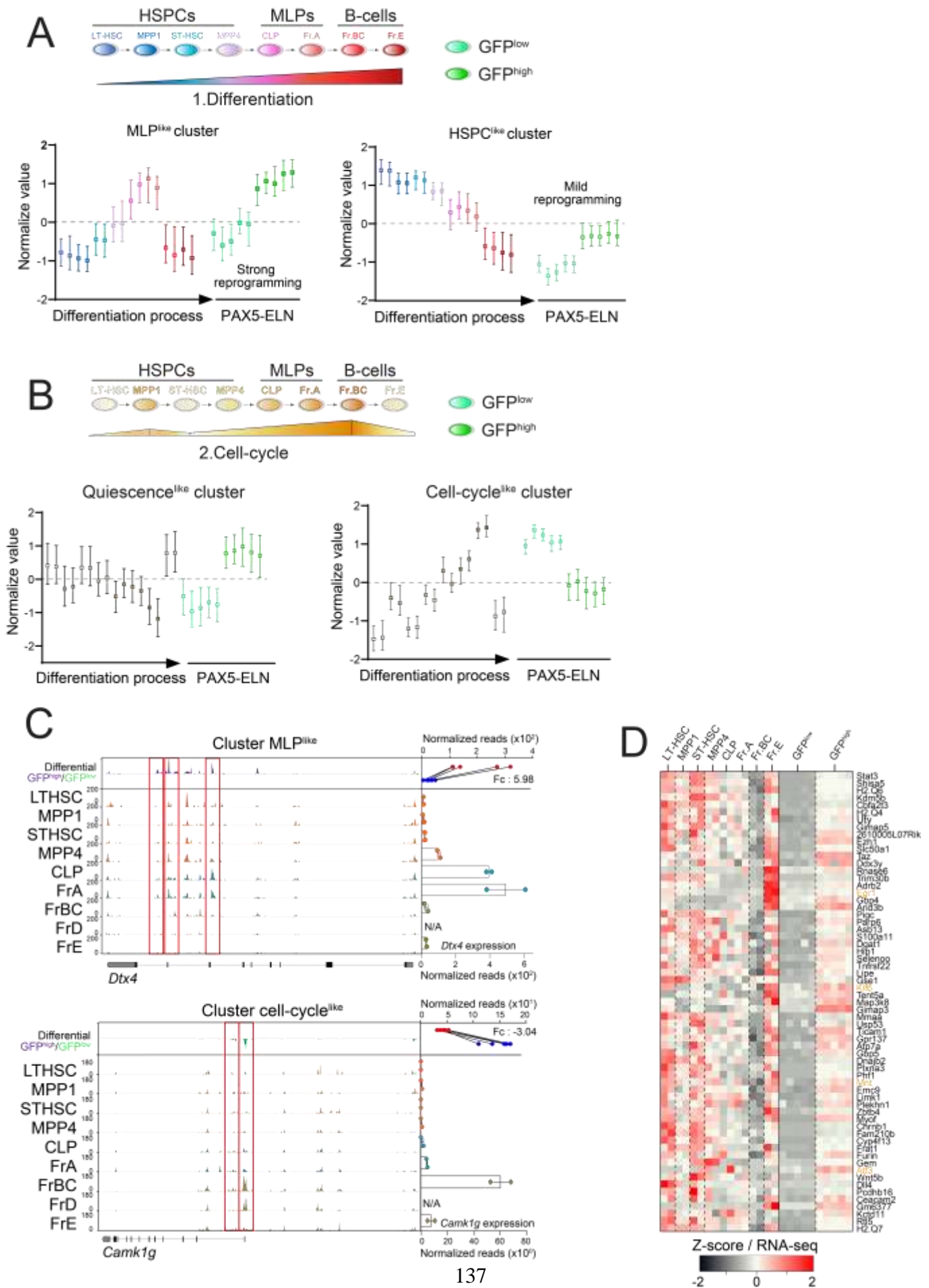
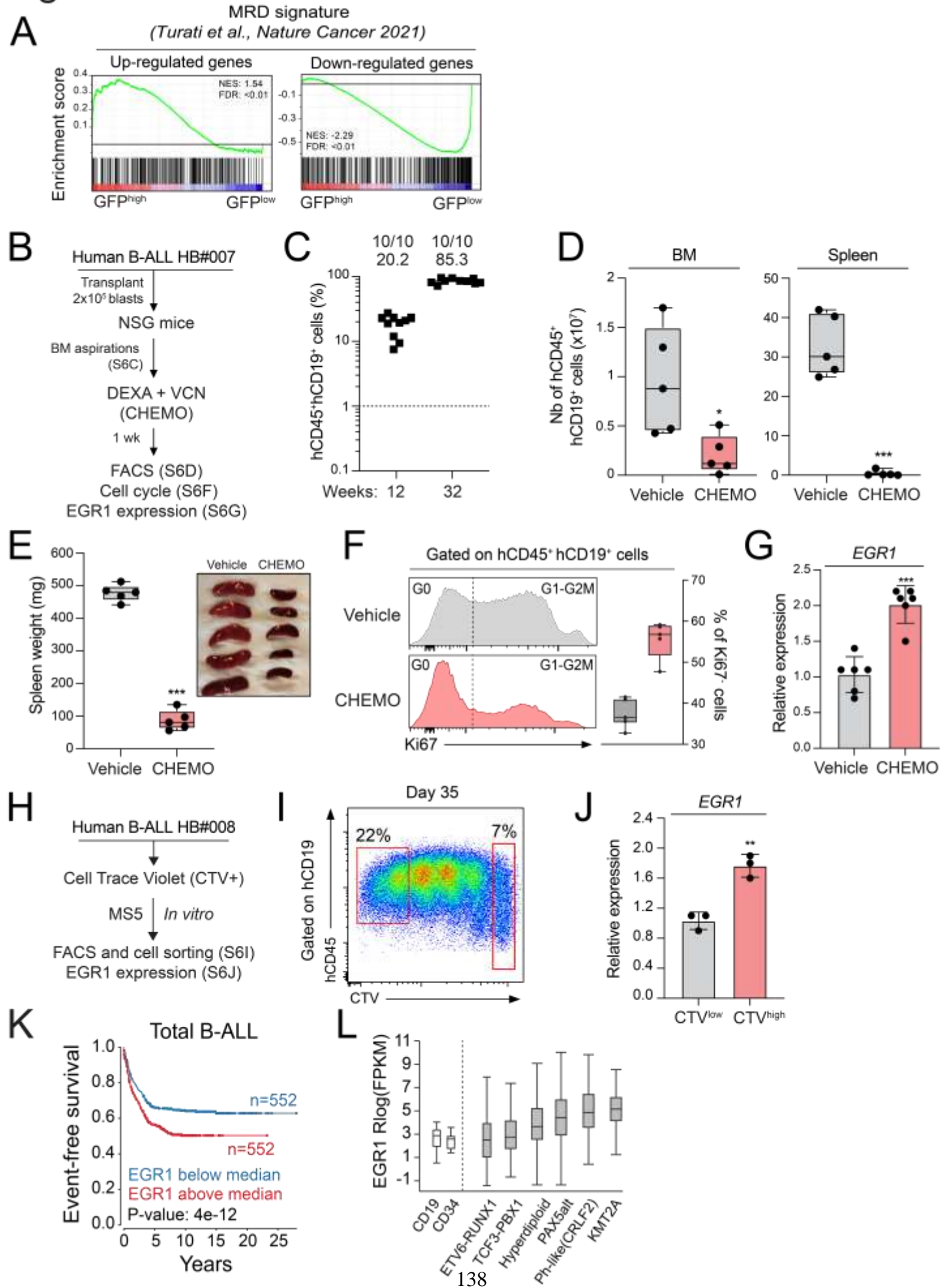


Figure S5.



# Figure S6.



**Supplementary Fig 4.** (A) Representative FACS analysis of GFP expression in the different B-cell subsets from wt *H2B-GFP<sup>tg</sup>* (left panels) and pre-leukemic *PE<sup>tg</sup>H2B-GFP<sup>tg</sup>* (right panels) mice after 0, 1, 2 and 3 weeks of DOX chase. The proportion of GFP<sup>high</sup> cells is indicated for each time point. (B) Heatmap of metascape results of the top selected pathways between all the differentially expressed genes between GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells. (C) Heatmap of enrichment analysis of differentially accessible regions obtained with Cistrome-GO. (D) Comparison of the accessibility footprint of Ebf (left panel) and Spi (right panel) motifs (ATAC-seq data) between GFP<sup>high</sup> (purple) and GFP<sup>low</sup> (green) cells. (E) GSEA of the well-established list of *in vivo* PAX5-activated genes (Revilla et al., 2012) between GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells. (F) Comparison of *Spi1* (left panel) and *Runx1* (right panel) expression (RNA-seq data) between GFP<sup>high</sup> (red) and GFP<sup>low</sup> (blue) cells. (G) GSEA of the established list of *in vivo* human HSC quiescence genes (Garcia-Prat et al., 2021) between GFP<sup>high</sup> (red) and GFP<sup>low</sup> (blue) cells.

**Supplementary Fig 5.** (A) Boxplot of normalized gene expression from the MLP<sup>like</sup> cluster (left panel) and the HSPC<sup>like</sup> cluster (right panel) in each sample of the normal B-lymphopoiesis (RNA-seq from ImmGenn consortium) and in GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> samples. (B) Boxplot of normalized gene expression from the Quiescence<sup>like</sup> cluster (left panel) and the Cell-cycle<sup>like</sup> cluster (right panel) in each sample of the normal compartments and in GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> samples. (C) Representative pile-up traces of ATAC-seq signals (left panel) for genomic region of *Dtx4* gene and *Camk1g* gene. mRNA levels are indicated with bar plots for each population from the normal lymphopoiesis and are shown in red and blue dots in GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> paired samples, respectively. (D) Heatmap of normalized expression of genes from the molecular network (TRN#1 of Fig. 5 D and Fig. 5 F) integrating the different subsets of the normal B-lymphopoiesis.

**Supplementary Fig 6.** (A) GSEA of the up- (left panel) and down- (right panel) regulated genes from residual human B-ALL cells after chemotherapies (Turati et al., 2021) between GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells. (B-G) Experimental procedure to explore EGR1 expression in resistant human B-ALL cells (B). Leukemic blasts from the “*de novo*” B-ALL patient HB#007 were transplanted into NSG mice (n=11). The proportion of hCD45<sup>+</sup>hCD19<sup>+</sup> B-ALL blasts in BM aspirations was assessed 12 and 32 weeks after transplantation (C). Engrafted mice were randomly selected for treatment (CHEMO, n=5) or not (vehicle, n=5) with a chemotherapeutic cocktail (DEXA+VCN) during 1 week. Human B-ALL reconstitution (number of hCD45<sup>+</sup>hCD19<sup>+</sup> B-ALL blasts) was monitored by FACS in the BM and the spleen after the treatment (D). Spleen weight was measured and picture of the spleen was shown (E). Ki67 expression was determined by FACS in blasts from the BM of treated and untreated mice (F). Engrafted blasts were purified and mRNA levels of the human *EGR1* were determined by quantitative RT-PCR and normalized to *ABL1* gene (G). (H-J) Experimental procedure to explore EGR1 expression in quiescent human B-ALL cells (H). Leukemic blasts from the “*de novo*” B-ALL patient HB#008 were stained with CTV and the number of cell divisions (D0 to D4-5) after the co-culture was then analyzed. Red dotted gates were used to purify the D0 (CTV<sup>high</sup>) and D4-5 (CTV<sup>low</sup>) populations (I) and the expression of human *EGR1* were determined by quantitative RT-PCR (J). (K) *EGR1* expression and its associated clinical outcome in B-ALL patient extracted from (Gu et al., 2019). Event-free survival (EFS) curves of total B-ALL patients with *EGR1* expression below (blue) and above (red) to the median. (L) *EGR1* expression in the different B-ALL oncogenic subgroups was shown.

**Supplementary Table 1.** List of FACS antibodies used for the phenotypic characterization of the B-cell lineage. The combination of markers for the multiparametric immunostaining used in each figure were indicated.

**Supplementary Table 2.** Results of differentially expressed genes of *PE<sup>tg</sup>* D0-2, *PE<sup>tg</sup>* D8-9 and Wt D8-9 cells analysed with DESeq2. Related to Fig. 3 D and E.

**Supplementary Table 3.** Results of differentially expressed genes (RNA-seq) of GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells analysed with DESeq2. Significantly differentially expressed genes were listed and used with Metascape tool to test the biological enrichment of pathway and Gene Ontology. Related to Fig. 4F, H, I, J and Fig. S4B, E, F, G.

**Supplementary Table 4.** Results of differentially accessible regions (ATAC-seq) of GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> cells and their associated TF activity analysed with diffTF pipeline. Related to [Fig. 4F, G](#) and [Fig. S4C](#).

**Supplementary Table 5.** Clustering data (Kmeans) of significantly modified genes (related to [Fig. 5 C](#), [Fig. S5 A, B](#) and [Table S3](#)) and peaks (related to [Fig. 5 B](#) and [Table S4](#)) from pre-leukemic GFP<sup>high</sup> and GFP<sup>low</sup> according to their signal in the different steps of the normal differentiation (extracted from RNA-seq and ATAC-seq Immgen datasets). Table of the “final” TRN and of the cluster-specific TRN#1 calculated with LASSO-StARS framework were provided. Related to [Fig. 6 D](#) and [F](#).

## References.

- Adelman, E.R., H.T. Huang, A. Roisman, A. Olsson, A. Colaprico, T. Qin, R.C. Lindsley, R. Bejar, N. Salomonis, H.L. Grimes, and M.E. Figueroa. 2019. Aging Human Hematopoietic Stem Cells Manifest Profound Epigenetic Reprogramming of Enhancers That May Predispose to Leukemia. *Cancer Discov* 9:1080-1101.
- Alexander, T.B., Z. Gu, I. Iacobucci, K. Dickerson, J.K. Choi, B. Xu, D. Payne-Turner, H. Yoshihara, M.L. Loh, J. Horan, B. Buldini, G. Basso, S. Elitzur, V. de Haas, C.M. Zwaan, A. Yeoh, D. Reinhardt, D. Tomizawa, N. Kiyokawa, T. Lammens, B. De Moerloose, D. Catchpoole, H. Hori, A. Moorman, A.S. Moore, O. Hrusak, S. Meshinchi, E. Orgel, M. Devidas, M. Borowitz, B. Wood, N.A. Heerema, A. Carrol, Y.L. Yang, M.A. Smith, T.M. Davidsen, L.C. Hermida, P. Gesuwan, M.A. Marra, Y. Ma, A.J. Mungall, R.A. Moore, S.J.M. Jones, M. Valentine, L.J. Janke, J.E. Rubnitz, C.H. Pui, L. Ding, Y. Liu, J. Zhang, K.E. Nichols, J.R. Downing, X. Cao, L. Shi, S. Pounds, S. Newman, D. Pei, J.M. Guidry Auvil, D.S. Gerhard, S.P. Hunger, H. Inaba, and C.G. Mullighan. 2018. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature* 562:373-379.
- Althoff, M.J., R.C. Nayak, S. Hegde, A.M. Wellendorf, B. Bohan, M.D. Filippi, M. Xin, Q.R. Lu, H. Geiger, Y. Zheng, M.T. Diaz-Meco, J. Moscat, and J.A. Cancelas. 2020. Yap1-Scribble polarization is required for hematopoietic stem cell division and fate. *Blood* 136:1824-1836.
- Aurrand-Lions, M., and S.J.C. Mancini. 2018. Murine Bone Marrow Niches from Hematopoietic Stem Cells to B Cells. *Int J Mol Sci* 19:
- Becht, E., L. McInnes, J. Healy, C.A. Dutertre, I.W.H. Kwok, L.G. Ng, F. Ginhoux, and E.W. Newell. 2018. Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol*
- Bendall, S.C., K.L. Davis, A.D. Amir el, M.D. Tadmor, E.F. Simonds, T.J. Chen, D.K. Shenfeld, G.P. Nolan, and D. Pe'er. 2014. Single-cell trajectory detection uncovers progression and regulatory coordination in human B cell development. *Cell* 157:714-725.
- Berest, I., C. Arnold, A. Reyes-Palomares, G. Palla, K.D. Rasmussen, H. Giles, P.M. Bruch, W. Huber, S. Dietrich, K. Helin, and J.B. Zaugg. 2019. Quantification of Differential Transcription Factor Activity and Multiomics-Based Classification into Activators and Repressors: diffTF. *Cell Rep* 29:3147-3159 e3112.
- Bousquet, M., C. Broccardo, C. Quelen, F. Meggetto, E. Kuhlein, G. Delsol, N. Dastugue, and P. Brousset. 2007. A novel PAX5-ELN fusion protein identified in B-cell acute lymphoblastic leukemia acts as a dominant negative on wild-type PAX5. *Blood* 109:3417-3423.
- Bradner, J.E., D. Hnisz, and R.A. Young. 2017. Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell* 168:629-643.
- Buenrostro, J.D., P.G. Giresi, L.C. Zaba, H.Y. Chang, and W.J. Greenleaf. 2013. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods* 10:1213-1218.
- Busslinger, M. 2004. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 22:55-79.
- Cabezas-Wallscheid, N., F. Buettner, P. Sommerkamp, D. Klimmeck, L. Ladel, F.B. Thalheimer, D. Pastor-Flores, L.P. Roma, S. Renders, P. Zeisberger, A. Przybylla, K. Schonberger, R. Scognamiglio, S. Altamura, C.M. Florian, M. Fawaz, D. Vonficht, M. Tesio, P. Collier, D. Pavlinic, H. Geiger, T. Schroeder, V. Benes, T.P. Dick, M.A. Rieger, O. Stegle, and A. Trumpp. 2017. Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy. *Cell* 169:807-823 e819.

- Chan, L.N., M.A. Murakami, M.E. Robinson, R. Caeser, T. Sadras, J. Lee, K.N. Cosgun, K. Kume, V. Khairnar, G. Xiao, M.A. Ahmed, E. Aghania, G. Deb, C. Hurtz, S. Shojaee, C. Hong, P. Polonen, M.A. Nix, Z. Chen, C.W. Chen, J. Chen, A. Vogt, M. Heinaniemi, O. Lohi, A.P. Wiita, S. Izraeli, H. Geng, D.M. Weinstock, and M. Muschen. 2020. Signalling input from divergent pathways subverts B cell transformation. *Nature* 583:845-851.
- Chavez, J.S., J.L. Rabe, D. Loeffler, K.C. Higa, G. Hernandez, T.S. Mills, N. Ahmed, R.L. Gessner, Z. Ke, B.M. Idler, K.E. Nino, H. Kim, J.R. Myers, B.M. Stevens, P. Davizon-Castillo, C.T. Jordan, H. Nakajima, J. Ashton, R.S. Welner, T. Schroeder, J. DeGregori, and E.M. Pietras. 2021. PU.1 enforces quiescence and limits hematopoietic stem cell expansion during inflammatory stress. *J Exp Med* 218:
- Chen, Y., M. Yu, X. Dai, M. Zogg, R. Wen, H. Weiler, and D. Wang. 2011. Critical role for Gimap5 in the survival of mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *J Exp Med* 208:923-935.
- Cherian, S., and L.A. Soma. 2021. How I Diagnose Minimal/Measurable Residual Disease in B Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma by Flow Cytometry. *Am J Clin Pathol* 155:38-54.
- Clark, M.R., M. Mandal, K. Ochiai, and H. Singh. 2014. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 14:69-80.
- Cobaleda, C., W. Jochum, and M. Busslinger. 2007a. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* 449:473-477.
- Cobaleda, C., A. Schebesta, A. Delogu, and M. Busslinger. 2007b. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 8:463-470.
- Coyaud, E., S. Struski, N. Prade, J. Familiades, R. Eichner, C. Quelen, M. Bousquet, F. Mugneret, P. Talmant, M.P. Pages, C. Lefebvre, D. Penther, E. Lippert, N. Nadal, S. Taviaux, B. Poppe, I. Luquet, L. Baranger, V. Eclache, I. Radford, C. Barin, M.J. Mozziconacci, M. Lafage-Pochitaloff, H. Antoine-Poirel, C. Charrin, C. Perot, C. Terre, P. Brousset, N. Dastugue, and C. Broccardo. 2010. Wide diversity of PAX5 alterations in B-ALL: a Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique study. *Blood* 115:3089-3097.
- Cozzio, A., E. Passegue, P.M. Ayton, H. Karsunky, M.L. Cleary, and I.L. Weissman. 2003. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* 17:3029-3035.
- Dobson, S.M., L. Garcia-Prat, R.J. Vanner, J. Wintersinger, E. Waanders, Z. Gu, J. McLeod, O.I. Gan, I. Grandal, D. Payne-Turner, M.N. Edmonson, X. Ma, Y. Fan, V. Voisin, M. Chan-Seng-Yue, S.Z. Xie, M. Hosseini, S. Abelson, P. Gupta, M. Rusch, Y. Shao, S.R. Olsen, G. Neale, S.M. Chan, G. Bader, J. Easton, C.J. Guidos, J.S. Danska, J. Zhang, M.D. Minden, Q. Morris, C.G. Mullighan, and J.E. Dick. 2020. Relapse-Fated Latent Diagnosis Subclones in Acute B Lineage Leukemia Are Drug Tolerant and Possess Distinct Metabolic Programs. *Cancer Discov*
- Ebinger, S., E.Z. Ozdemir, C. Ziegenhain, S. Tiedt, C. Castro Alves, M. Grunert, M. Dworzak, C. Lutz, V.A. Turati, T. Enver, H.P. Horny, K. Sotlar, S. Parekh, K. Spiekermann, W. Hiddemann, A. Schepers, B. Polzer, S. Kirsch, M. Hoffmann, B. Knapp, J. Hasenauer, H. Pfeifer, R. Panzer-Grumayer, W. Enard, O. Gires, and I. Jeremias. 2016. Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer cell* 30:849-862.
- Familiades, J., M. Bousquet, M. Lafage-Pochitaloff, M.C. Bene, K. Beldjord, J. De Vos, N. Dastugue, E. Coyaud, S. Struski, C. Quelen, N. Prade-Houdellier, S. Dobbstein, J.M. Cayuela, J. Soulier, N. Grardel, C. Preudhomme, H. Cave, O. Blanchet, V. Lheritier, A.

- Delannoy, Y. Chalandon, N. Ifrah, A. Pigneux, P. Brousset, E.A. Macintyre, F. Huguet, H. Dombret, C. Broccardo, and E. Delabesse. 2009. PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study. *Leukemia* 23:1989-1998.
- Foudi, A., K. Hochedlinger, D. Van Buren, J.W. Schindler, R. Jaenisch, V. Carey, and H. Hock. 2009. Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 27:84-90.
- Fregona, V., M. Bayet, and B. Gerby. 2021. Oncogene-Induced Reprogramming in Acute Lymphoblastic Leukemia: Towards Targeted Therapy of Leukemia-Initiating Cells. *Cancers (Basel)* 13:
- Garcia-Prat, L., K.B. Kaufmann, F. Schneiter, V. Voisin, A. Murison, J. Chen, M. Chan-Seng-Yue, O.I. Gan, J.L. McLeod, S.A. Smith, M.C. Shoong, D. Parris, K. Pan, A.G.X. Zeng, G. Krivdova, K. Gupta, S.I. Takayanagi, E. Wagenblast, W. Wang, M. Lupien, T. Schroeder, S.Z. Xie, and J.E. Dick. 2021. TFEB-mediated endolysosomal activity controls human hematopoietic stem cell fate. *Cell stem cell* 28:1838-1850 e1810.
- Gerby, B., C.S. Tremblay, M. Tremblay, S. Rojas-Sutterlin, S. Herblot, J. Hebert, G. Sauvageau, S. Lemieux, E. Lecuyer, D.F. Veiga, and T. Hoang. 2014. SCL, LMO1 and Notch1 Reprogram Thymocytes into Self-Renewing Cells. *PLoS Genet* 10:e1004768.
- Gerby, B., D.F. Veiga, J. Krosel, S. Nourreddine, J. Ouellette, A. Haman, G. Lavoie, I. Fares, M. Tremblay, V. Litalien, E. Ottoni, M. Kosic, D. Geoffrion, J. Ryan, P.S. Maddox, J. Chagraoui, A. Marinier, J. Hebert, G. Sauvageau, B.H. Kwok, P.P. Roux, and T. Hoang. 2016. High-throughput screening in niche-based assay identifies compounds to target preleukemic stem cells. *J Clin Invest*
- Gontarz, P., S. Fu, X. Xing, S. Liu, B. Miao, V. Bazylianska, A. Sharma, P. Madden, K. Cates, A. Yoo, A. Moszczynska, T. Wang, and B. Zhang. 2020. Comparison of differential accessibility analysis strategies for ATAC-seq data. *Sci Rep* 10:10150.
- Good, Z., J. Sarno, A. Jager, N. Samusik, N. Aghaeepour, E.F. Simonds, L. White, N.J. Lacayo, W.J. Fantl, G. Fazio, G. Gaipa, A. Biondi, R. Tibshirani, S.C. Bendall, G.P. Nolan, and K.L. Davis. 2018. Single-cell developmental classification of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia at diagnosis reveals predictors of relapse. *Nat Med* 24:474-483.
- Greaves, M. 2018. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 18:471-484.
- Gu, Z., M.L. Churchman, K.G. Roberts, I. Moore, X. Zhou, J. Nakitandwe, K. Hagiwara, S. Pelletier, S. Gingras, H. Berns, D. Payne-Turner, A. Hill, I. Iacobucci, L. Shi, S. Pounds, C. Cheng, D. Pei, C. Qu, S. Newman, M. Devidas, Y. Dai, S.C. Reshmi, J. Gastier-Foster, E.A. Raetz, M.J. Borowitz, B.L. Wood, W.L. Carroll, P.A. Zweidler-McKay, K.R. Rabin, L.A. Mattano, K.W. Maloney, A. Rambaldi, O. Spinelli, J.P. Radich, M.D. Minden, J.M. Rowe, S. Luger, M.R. Litzow, M.S. Tallman, J. Racevskis, Y. Zhang, R. Bhatia, J. Kohlschmidt, K. Mrozek, C.D. Bloomfield, W. Stock, S. Kornblau, H.M. Kantarjian, M. Konopleva, W.E. Evans, S. Jeha, C.H. Pui, J. Yang, E. Paietta, J.R. Downing, M.V. Relling, J. Zhang, M.L. Loh, S.P. Hunger, and C.G. Mullighan. 2019. PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 51:296-307.
- Hardy, R.R., and K. Hayakawa. 2001. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19:595-621.
- Hardy, R.R., Y.S. Li, D. Allman, M. Asano, M. Gui, and K. Hayakawa. 2000. B-cell commitment, development and selection. *Immunol Rev* 175:23-32.



- Hassanein, N.M., F. Alcancia, K.R. Perkinson, P.J. Buckley, and A.S. Lagoo. 2009. Distinct expression patterns of CD123 and CD34 on normal bone marrow B-cell precursors ("hematogones") and B lymphoblastic leukemia blasts. *Am J Clin Pathol* 132:573-580.
- Hong, D., R. Gupta, P. Ancliff, A. Atzberger, J. Brown, S. Soneji, J. Green, S. Colman, W. Piacibello, V. Buckle, S. Tsuzuki, M. Greaves, and T. Enver. 2008. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* 319:336-339.
- Huntly, B.J., H. Shigematsu, K. Deguchi, B.H. Lee, S. Mizuno, N. Duclos, R. Rowan, S. Amaral, D. Curley, I.R. Williams, K. Akashi, and D.G. Gilliland. 2004. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* 6:587-596.
- Imperato, M.R., P. Cauchy, N. Obier, and C. Bonifer. 2015. The RUNX1-PU.1 axis in the control of hematopoiesis. *Int J Hematol* 101:319-329.
- Inaba, H., and C.G. Mullighan. 2020. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 105:2524-2539.
- Inaba, H., and C.H. Pui. 2021. Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Med* 10:
- Jamrog, L., G. Chemin, V. Fregona, L. Coster, M. Pasquet, C. Oudinet, N. Rouquie, N. Prade, S. Lagarde, C. Cresson, S. Hebrard, N.S. Nguyen Huu, M. Bousquet, C. Quelen, P. Brousset, S.J.C. Mancini, E. Delabesse, A.A. Khamlichi, B. Gerby, and C. Broccardo. 2018. PAX5-ELN oncoprotein promotes multistep B-cell acute lymphoblastic leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:10357-10362.
- Jurado, S., A.S. Fedl, M. Jaritz, D. Kostanova-Poliakova, S.G. Malin, C.G. Mullighan, S. Strehl, M. Fischer, and M. Busslinger. 2022. The PAX5-JAK2 translocation acts as dual-hit mutation that promotes aggressive B-cell leukemia via nuclear STAT5 activation. *EMBO J* 41:e108397.
- Katerndahl, C.D.S., L.M. Heltemes-Harris, M.J.L. Willette, C.M. Henzler, S. Fietze, R. Yang, H. Schjerven, K.A.T. Silverstein, L.B. Ramsey, G. Hubbard, A.D. Wells, R.P. Kuiper, B. Scheijen, F.N. van Leeuwen, M. Muschen, S.M. Kornblau, and M.A. Farrar. 2017. Antagonism of B cell enhancer networks by STAT5 drives leukemia and poor patient survival. *Nat Immunol* 18:694-704.
- Krivtsov, A.V., D. Twomey, Z. Feng, M.C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J.E. Levine, J. Wang, W.C. Hahn, D.G. Gilliland, T.R. Golub, and S.A. Armstrong. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442:818-822.
- Langmead, B., and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357-359.
- Li, Z., M.H. Schulz, T. Look, M. Begemann, M. Zenke, and I.G. Costa. 2019. Identification of transcription factor binding sites using ATAC-seq. *Genome Biol* 20:45.
- Liu, Y., Y. Chen, X. Deng, and J. Zhou. 2020. ATF3 Prevents Stress-Induced Hematopoietic Stem Cell Exhaustion. *Front Cell Dev Biol* 8:585771.
- Love, M.I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.
- Malta, T.M., A. Sokolov, A.J. Gentles, T. Burzykowski, L. Poisson, J.N. Weinstein, B. Kaminska, J. Huelsken, L. Omberg, O. Gevaert, A. Colaprico, P. Czerwinska, S. Mazurek, L. Mishra, H. Heyn, A. Krasnitz, A.K. Godwin, A.J. Lazar, N. Cancer Genome Atlas Research, J.M. Stuart, K.A. Hoadley, P.W. Laird, H. Noushmehr, and M. Wiznerowicz. 2018. Machine Learning Identifies Stemness Features Associated with Oncogenic Dedifferentiation. *Cell* 173:338-354 e315.

- McCormack, M.P., L.F. Young, S. Vasudevan, C.A. de Graaf, R. Codrington, T.H. Rabbitts, S.M. Jane, and D.J. Curtis. 2010. The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. *Science* 327:879-883.
- Min, I.M., G. Pietramaggiori, F.S. Kim, E. Passegue, K.E. Stevenson, and A.J. Wagers. 2008. The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* 2:380-391.
- Miraldi, E.R., M. Pokrovskii, A. Watters, D.M. Castro, N. De Veaux, J.A. Hall, J.Y. Lee, M. Ciofani, A. Madar, N. Carriero, D.R. Littman, and R. Bonneau. 2019. Leveraging chromatin accessibility for transcriptional regulatory network inference in T Helper 17 Cells. *Genome Res* 29:449-463.
- Monaco, G., H. Chen, M. Poidinger, J. Chen, J.P. de Magalhaes, and A. Larbi. 2016. flowAI: automatic and interactive anomaly discerning tools for flow cytometry data. *Bioinformatics* 32:2473-2480.
- Mullighan, C.G., S. Goorha, I. Radtke, C.B. Miller, E. Coustan-Smith, J.D. Dalton, K. Girtman, S. Mathew, J. Ma, S.B. Pounds, X. Su, C.H. Pui, M.V. Relling, W.E. Evans, S.A. Shurtleff, and J.R. Downing. 2007. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446:758-764.
- Mullighan, C.G., L.A. Phillips, X. Su, J. Ma, C.B. Miller, S.A. Shurtleff, and J.R. Downing. 2008. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 322:1377-1380.
- Ng, S.W., A. Mitchell, J.A. Kennedy, W.C. Chen, J. McLeod, N. Ibrahimova, A. Arruda, A. Popescu, V. Gupta, A.D. Schimmer, A.C. Schuh, K.W. Yee, L. Bullinger, T. Herold, D. Gorlich, T. Buchner, W. Hiddemann, W.E. Berdel, B. Wormann, M. Cheok, C. Preudhomme, H. Dombret, K. Metzeler, C. Buske, B. Lowenberg, P.J. Valk, P.W. Zandstra, M.D. Minden, J.E. Dick, and J.C. Wang. 2016. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature* 540:433-437.
- Nutt, S.L., B. Heavey, A.G. Rolink, and M. Busslinger. 1999. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401:556-562.
- Patterson, H.C., C. Gerbeth, P. Thiru, N.F. Vogtle, M. Knoll, A. Shahsafaei, K.E. Samocha, C.X. Huang, M.M. Harden, R. Song, C. Chen, J. Kao, J. Shi, W. Salmon, Y.D. Shaul, M.P. Stokes, J.C. Silva, G.W. Bell, D.G. MacArthur, J. Ruland, C. Meisinger, and H.F. Lodish. 2015. A respiratory chain controlled signal transduction cascade in the mitochondrial intermembrane space mediates hydrogen peroxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E5679-5688.
- Picelli, S., O.R. Faridani, A.K. Bjorklund, G. Winberg, S. Sagasser, and R. Sandberg. 2014. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* 9:171-181.
- Pokrovskii, M., J.A. Hall, D.E. Ochayon, R. Yi, N.S. Chaimowitz, H. Seelamneni, N. Carriero, A. Watters, S.N. Waggoner, D.R. Littman, R. Bonneau, and E.R. Miraldi. 2019. Characterization of Transcriptional Regulatory Networks that Promote and Restrict Identities and Functions of Intestinal Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 51:185-197 e186.
- Prost, S., F. Relouzat, M. Spentchian, Y. Ouzegdouh, J. Saliba, G. Massonnet, J.P. Beressi, E. Verhoeyen, V. Ragueneau, B. Maneglier, S. Castaigne, C. Chomienne, S. Chretien, P. Rousselot, and P. Leboulch. 2015. Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPARgamma agonists. *Nature* 525:380-383.
- Ramamoorthy, S., K. Kometani, J.S. Herman, M. Bayer, S. Boller, J. Edwards-Hicks, H. Ramachandran, R. Li, R. Klein-Geltink, E.L. Pearce, D. Grun, and R. Grosschedl. 2020. EBF1 and Pax5 safeguard leukemic transformation by limiting IL-7 signaling, Myc expression, and folate metabolism. *Genes Dev* 34:1503-1519.

- Reske, J.J., M.R. Wilson, and R.L. Chandler. 2020. ATAC-seq normalization method can significantly affect differential accessibility analysis and interpretation. *Epigenetics Chromatin* 13:22.
- Reth, M. 2002. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* 3:1129-1134.
- Reth, M., and P. Nielsen. 2014. Signaling circuits in early B-cell development. *Adv Immunol* 122:129-175.
- Revilla, I.D.R., I. Bilic, B. Vilagos, H. Tagoh, A. Ebert, I.M. Tamir, L. Smeenk, J. Trupke, A. Sommer, M. Jaritz, and M. Busslinger. 2012. The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcriptional programmes in early and late B lymphopoiesis. *EMBO J* 31:3130-3146.
- Rodriguez-Hernandez, G., A. Casado-Garcia, M. Isidro-Hernandez, D. Picard, J. Raboso-Gallego, S. Aleman-Arteaga, A. Orfao, O. Blanco, S. Riesco, P. Prieto-Matos, F.J. Garcia Criado, M.B. Garcia Cenador, H. Hock, T. Enver, I. Sanchez-Garcia, and C. Vicente-Duenas. 2021. The Second Oncogenic Hit Determines the Cell Fate of ETV6-RUNX1 Positive Leukemia. *Front Cell Dev Biol* 9:704591.
- Roederer, M. 2011. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. *Cytometry A* 79:95-101.
- Rolink, A., and F. Melchers. 1996. B-cell development in the mouse. *Immunol Lett* 54:157-161.
- Scheicher, R., A. Hoelbl-Kovacic, F. Bellutti, A.S. Tigan, M. Prchal-Murphy, G. Heller, C. Schneckenleithner, M. Salazar-Roa, S. Zochbauer-Muller, J. Zuber, M. Malumbres, K. Kollmann, and V. Sexl. 2015. CDK6 as a key regulator of hematopoietic and leukemic stem cell activation. *Blood* 125:90-101.
- Smeenk, L., M. Fischer, S. Jurado, M. Jaritz, A. Azaryan, B. Werner, M. Roth, J. Zuber, M. Stanulla, M.L. den Boer, C.G. Mullighan, S. Strehl, and M. Busslinger. 2017. Molecular role of the PAX5-ETV6 oncoprotein in promoting B-cell acute lymphoblastic leukemia. *EMBO J* 36:718-735.
- Staber, P.B., P. Zhang, M. Ye, R.S. Welner, E. Levantini, A. Di Ruscio, A.K. Ebralidze, C. Bach, H. Zhang, J. Zhang, K. Vanura, R. Delwel, H. Yang, G. Huang, and D.G. Tenen. 2014. The Runx-PU.1 pathway preserves normal and AML/ETO9a leukemic stem cells. *Blood* 124:2391-2399.
- Stoddart, A., A.A. Fernald, E.M. Davis, M.E. McNerney, and M.M. Le Beau. 2022. EGR1 Haploinsufficiency Confers a Fitness Advantage to Hematopoietic Stem Cells Following Chemotherapy. *Exp Hematol* 115:54-67.
- Tomura, M., A. Sakaue-Sawano, Y. Mori, M. Takase-Utsugi, A. Hata, K. Ohtawa, O. Kanagawa, and A. Miyawaki. 2013. Contrasting quiescent G0 phase with mitotic cell cycling in the mouse immune system. *PLoS one* 8:e73801.
- Tremblay, C.S., J. Saw, S.K. Chiu, N.C. Wong, K. Tsyganov, S. Ghotb, A.N. Graham, F. Yan, A.A. Guirguis, S.E. Sonderegger, N. Lee, P. Kalitsis, J. Reynolds, S.B. Ting, D.R. Powell, S.M. Jane, and D.J. Curtis. 2018. Restricted cell cycle is essential for clonal evolution and therapeutic resistance of pre-leukemic stem cells. *Nat Commun* 9:3535.
- Trumpp, A., M. Essers, and A. Wilson. 2010. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 10:201-209.
- Turati, V.A., J.A. Guerra-Assuncao, N.E. Potter, R. Gupta, S. Ecker, A. Daneviciute, M. Tarabichi, A.P. Webster, C. Ding, G. May, C. James, J. Brown, L. Conde, L.J. Russell, P. Ancliff, S. Inglott, G. Cazzaniga, A. Biondi, G.W. Hall, M. Lynch, M. Hubank, I. Macaulay, S. Beck, P. Van Loo, S.E. Jacobsen, M. Greaves, J. Herrero, and T. Enver. 2021. Chemotherapy induces canalization of cell state in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Cancer* 2:835-852.

- van Delft, F.W., S. Horsley, S. Colman, K. Anderson, C. Bateman, H. Kempinski, J. Zuna, C. Eckert, V. Saha, L. Kearney, A. Ford, and M. Greaves. 2011. Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 117:6247-6254.
- Van Gassen, S., B. Gaudilliere, M.S. Angst, Y. Saeys, and N. Aghaeepour. 2020. CytoNorm: A Normalization Algorithm for Cytometry Data. *Cytometry A* 97:268-278.
- Vazquez-Santillan, K., J. Melendez-Zajgla, L. Jimenez-Hernandez, G. Martinez-Ruiz, and V. Maldonado. 2015. NF-kappaB signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target? *Cell Oncol (Dordr)* 38:327-339.
- Venezia, T.A., A.A. Merchant, C.A. Ramos, N.L. Whitehouse, A.S. Young, C.A. Shaw, and M.A. Goodell. 2004. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* 2:e301.
- Waanders, E., Z. Gu, S.M. Dobson, Z. Antic, J.C. Crawford, X. Ma, M.N. Edmonson, D. Payne-Turner, M. van der Vorst, M.C.J. Jongmans, I. McGuire, X. Zhou, J. Wang, L. Shi, S. Pounds, D. Pei, C. Cheng, G. Song, Y. Fan, Y. Shao, M. Rusch, K. McCastlain, J. Yu, R. van Boxtel, F. Blokzijl, I. Iacobucci, K.G. Roberts, J. Wen, G. Wu, J. Ma, J. Easton, G. Neale, S.R. Olsen, K.E. Nichols, C.H. Pui, J. Zhang, W.E. Evans, M.V. Relling, J.J. Yang, P.G. Thomas, J.E. Dick, R.P. Kuiper, and C.G. Mullighan. 2020. Mutational landscape and patterns of clonal evolution in relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Discov* 1:96-111.
- Wilson, A., E. Laurenti, G. Oser, R.C. van der Wath, W. Blanco-Bose, M. Jaworski, S. Offner, C.F. Dunant, L. Eshkind, E. Bockamp, P. Lio, H.R. Macdonald, and A. Trumpp. 2008. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135:1118-1129.
- Wojiski, S., F.C. Guibal, T. Kindler, B.H. Lee, J.L. Jesneck, A. Fabian, D.G. Tenen, and D.G. Gilliland. 2009. PML-RARalpha initiates leukemia by conferring properties of self-renewal to committed promyelocytic progenitors. *Leukemia* 23:1462-1471.
- Yamashita, M., and E. Passegue. 2019. TNF-alpha Coordinates Hematopoietic Stem Cell Survival and Myeloid Regeneration. *Cell Stem Cell* 25:357-372 e357.
- Yan, F., N.C. Wong, D.R. Powell, and D.J. Curtis. 2020. A 9-gene score for risk stratification in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 34:3070-3074.
- Zhang, Y.W., J. Mess, N. Aizarani, P. Mishra, C. Johnson, M.C. Romero-Mulero, J. Rettkowski, K. Schonberger, N. Obier, K. Jacklein, N.M. Woessner, M.E. Lalioti, T. Velasco-Hernandez, K. Sikora, R. Wasch, B. Lehnertz, G. Sauvageau, T. Manke, P. Menendez, S.G. Walter, S. Minguet, E. Laurenti, S. Gunther, D. Grun, and N. Cabezas-Wallscheid. 2022. Hyaluronic acid-GPRC5C signalling promotes dormancy in haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* 24:1038-1048.

## Résumé graphique des résultats obtenus

Dans l'ensemble, mes résultats indiquent qu'une population B pré-leucémique aberrante contient des cellules quiescentes qui sont résistantes aux agents conventionnels de chimiothérapie, qui ont perdu partiellement leur identité de cellules B au profit de la réactivation d'un programme moléculaire de CSPHs normales, et qui sont à l'origine de l'initiation et la transformation tumorale (Figure 49).

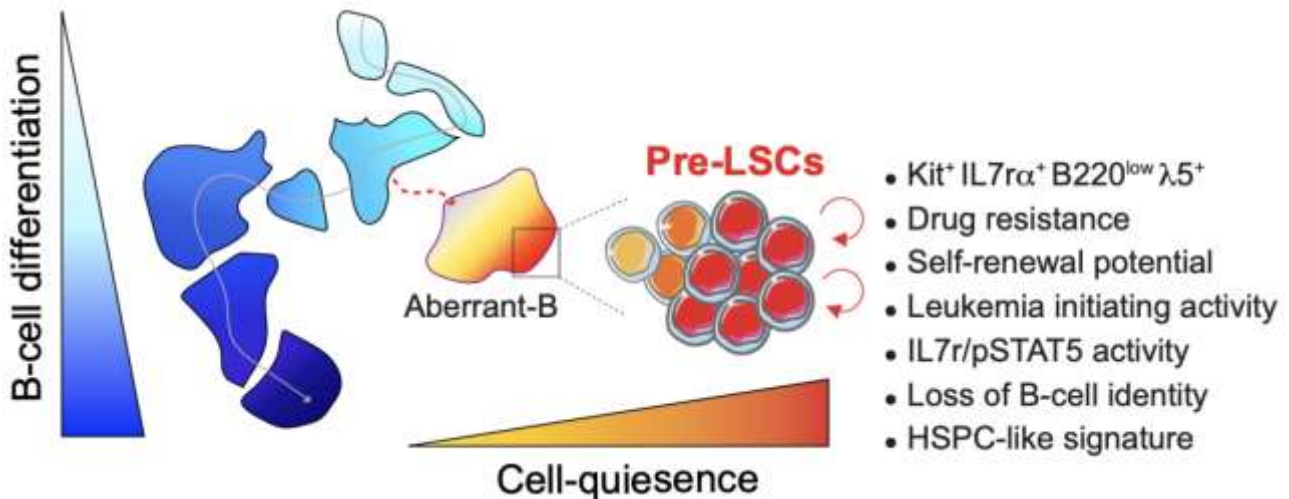


Figure 49 : Illustration graphique des résultats obtenus récapitulant les caractéristiques phénotypiques, fonctionnelles et moléculaires des pré-CSLs PAX5-ELN mises en évidence par mes travaux de thèse.

Dans la suite de ce manuscrit, j'ai choisi de développer dans une première partie une réflexion globale autour de mes résultats et notamment de discuter leur potentielle portée clinique. Cette réflexion s'articulera autour de la description d'expériences que je considère comme pertinentes pour développer et étayer mes hypothèses.

Dans une deuxième partie, je discuterai les différentes perspectives directes de mon étude, en exposant les travaux déjà initiés dans le laboratoire et pour lesquels j'ai été impliqué durant ma thèse.

## DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS

### Prendre avantage du phénotype aberrant des pré-CSLs pour leur identification chez l'Homme

Mes résultats indiquent que l'oncogène primaire PAX5-ELN perturbe la différenciation B et permet ainsi l'émergence de cellules au phénotype aberrant au stade pré-leucémique. Les cellules aberrantes  $PE^{tg}$  ne se retrouvent pas bloquées à un stade de la différenciation précis. En effet, l'exploration de certains marqueurs tels que BP1, CD2, CD25, et  $Ig\kappa\lambda$  révèle une progression phénotypique au sein même des cellules aberrantes  $PE^{tg}$ , réminiscence d'une différenciation B normale (**Fig 1A**). En revanche, la nature aberrante de cette population s'explique par l'expression inappropriée et concomitante des marqueurs B220, Kit, IL7r, IgM et  $\lambda 5$  (**Fig 1C**). Il est montré que la prise en compte de l'hétérogénéité leucémique est importante pour comprendre précisément la pathologie ([Hanahan 2022](#)) et mes résultats indiquent que l'étude de l'hétérogénéité du stade pré-leucémique est tout aussi cruciale. De nombreuses études utilisant des modèles murins de LAL stipulent que le stade pré-leucémique se définit par un blocage complet de la différenciation, et considèrent donc les cellules pré-leucémiques comme une entité relativement homogène ([Smeenk et al. 2017](#); [Ramamoorthy et al. 2020](#)). Mes résultats vont à l'encontre de ce type de représentation et soulignent qu'un oncogène primaire peut bloquer la différenciation de façon partielle, faisant du stade pré-leucémique un continuum de cellules altérées. Ce constat est souligné par les études menées par l'équipe de Katia Georgopoulos, démontrant que tous les stades de la différenciation B ne sont pas impactés de la même façon par un oncogène ([Hu et al. 2016](#); [Georgopoulos 2017](#)).

Combinées au phénotype aberrant des cellules leucémiques de la MRD chez l'homme ([Theunissen et al. 2017](#)) et des cellules pré-leucémiques des jumelles monochorioniques ETV6-RUNX1 ([Hong et al. 2008](#)), mes résultats obtenus à l'aide du modèle de souris PAX5-ELN renforcent l'idée que la combinaison inappropriée de marqueurs phénotypiques pourrait être une approche fiable pour identifier des cellules pré-leucémiques chez le patient. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, une part non négligeable de la population possède des cellules pré-leucémiques de LAL-B à la naissance (0,6% pour TCF3-PBX1 et 3% pour ETV6-RUNX1), dû à l'acquisition de l'évènement oncogénique primaire *in utero* ([Zuna et al. 2011](#); [Hein et al. 2019](#)). Actuellement, l'étude des cellules pré-leucémiques, que cela soit au niveau fonctionnelle ou moléculaire, passe essentiellement par des modélisations murines ou *in vitro*. En effet, leur détection chez l'Homme dans le but de les isoler et les étudier est particulièrement challengeant. Parmi les approches possibles, le « single-cell » RNA-seq couplé à du « targeted genome

sequencing » pourrait être intéressant, mais la fréquence de la population pré-leucémique à la naissance étant particulièrement faible (0,01 à 0,0001% des cellules CD19<sup>+</sup>), il n'est pas réaliste de séquencer 200 000 cellules CD19<sup>+</sup> par individu.

De plus, il semble nécessaire d'être capable d'identifier des cellules portant différents événements primaires. Pour surpasser ces problèmes, il faudrait théoriquement utiliser des marqueurs représentatifs d'une perturbation amenée quel que soit l'oncogène. C'est pourquoi il serait intéressant de se focaliser sur des gains fonctionnels tel que l'auto-renouvellement ou la quiescence cellulaire. En effet, comme mes résultats et ceux d'autres études le reportent ([Hong et al. 2008](#); [Duque-Afonso et al. 2015](#)), un oncogène primaire reprogramme des propriétés d'auto-renouvellement à un progéniteur pré-leucémique. Néanmoins, l'identification de ce trait fonctionnel chez l'homme me semble compliqué car il nécessiterait la transplantation de souris NSG en grand nombre. Enfin, mes résultats, corroborés par ceux d'autres études dans les LAL ([Tremblay et al. 2018](#); [Mehtonen et al. 2020](#)), indiquent qu'un gain de quiescence cellulaire induit par l'action d'un oncogène primaire, est une caractéristique commune des pré-CSLs.

Mis ensemble, ces notions m'amènent donc à penser qu'il serait possible de tirer profit du caractère phénotypique et fonctionnel aberrant des cellules pré-leucémiques pour leur détection chez l'Homme. C'est pourquoi il serait pertinent d'inclure pour cela des marqueurs du cycle cellulaire tel que le ki67, combiné à un phénotypage multiparamétrique en cytométrie, pour la détection des cellules pré-leucémiques dans le sang de cordon. L'avantage de la cytométrie en flux est la combinaison d'une résolution « single-cell » pour un coût et un temps d'acquisition faible (plusieurs millions de cellules pour quelques minutes). Afin d'identifier par cytométrie les pré-CSLs chez l'Homme, je proposerais donc de combiner une approche de RT-qPCR ciblant des oncogènes primaires (ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1) à partir de cellules enrichies en CD34<sup>+</sup> et en CD19<sup>+</sup> de sang de cordon, avec un panel complexe de cytométrie. L'approche par RT-qPCR nous permettrait qualitativement de valider si un échantillon est positif ou non et nous orienterait sur les proportions attendues de pré-CSLs. En cas de positivité, un panel de cytométrie spécifique serait utilisé.

Lors de ma thèse, j'ai mis en place un panel d'anticorps en cytométrie de flux permettant de discriminer les LAL-B humaines tout en les remplaçant dans la différenciation B normale humaine ([Figure 50](#)). Celui-ci est inspiré des différents panels de l'équipe de Nolan ([Bendall et al. 2014](#); [Good et al. 2018](#)) combinés à certains marqueurs de la MRD (CD81, CD58). Il pourrait

servir de proposition de départ à l'élaboration d'un panel capable de discriminer des pré-CSLs chez l'homme. Ce panel, associé au marqueur Ki67, permettrait de discriminer des cellules aberrantes pré-leucémiques de par : (1) un niveau de quiescence aberrant dans une population (marqueurs de cycle cellulaire), (2) la combinaison anormale de marqueurs phénotypiques (marqueurs de la différenciation) et (3) un niveau d'expression anormale de marqueurs phénotypiques (marqueurs de la MRD).

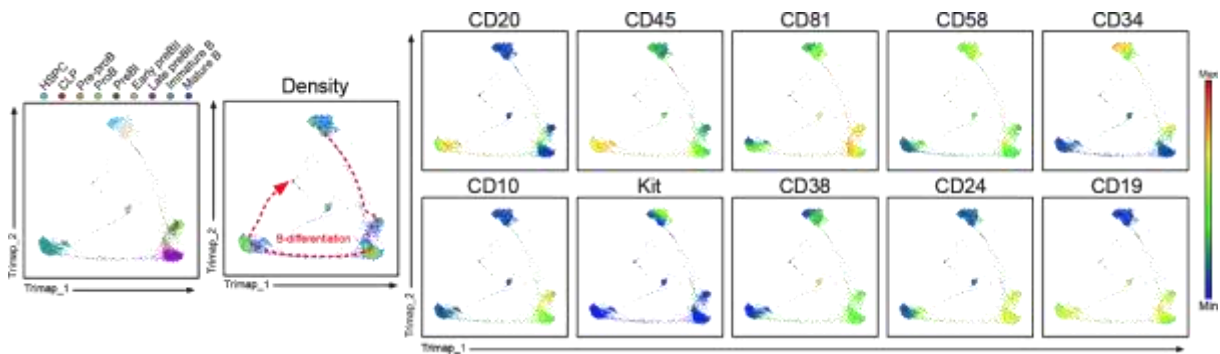


Figure 50 : Réduction dimensionnel en Trimap de cellules de moelle osseuse de sujets sains fenêtré sur les cellules CD34<sup>+</sup> associé aux cellules CD19<sup>+</sup>.

### La polarisation du pré-BCR permet-elle des divisions asymétriques pour maintenir l'activité des pré-CSLs ?

Une des propriétés fonctionnelles que l'oncogène *PAX5-ELN* confère aux cellules pré-leucémiques est la capacité d'auto-renouvellement. Celle-ci est décrite comme étant dépendante de deux mécanismes interconnectés : le premier est la localisation des cellules pré-leucémiques au sein de niches hématopoïétiques et le second est la mise en place de mécanismes de division permettant leur maintien et leur expansion.

Au stade pré-leucémique, les poids des rates des souris *PAX5-ELN* sont inférieurs à ceux des souris sauvages, reflet du blocage partiel de différenciation observé dans la moelle osseuse (Jamrog et al. 2018). De plus, les rates des souris pré-leucémiques ne comportent pas/très peu de cellules aberrantes, suggérant une dépendance majeure des pré-CSLs pour leur environnement médullaire. Aussi, malgré que la prolifération des cellules aberrantes soit globalement diminuée comparativement aux cellules de la lymphopoïèse B normale (**Fig 2E-F, 4B**) on observe leur expansion dans le temps. En effet, la proportion des cellules aberrantes au sein des cellules B est de 40% à 26 jours et augmente jusqu'à un seuil de 80% à 90 jours, seuil qui ne sera dépasser qu'après l'acquisition d'une mutation secondaire. Ces résultats suggèrent fortement des capacités d'auto-renouvellement à l'état d'équilibre. En conditions challengées, mes expériences de transplantations valident ce gain de capacités d'auto-



renouvellement des cellules exprimant l'oncogène (**Fig 1D-I**) et plus spécifiquement des cellules quiescentes (**Fig 2I**). De plus, mes résultats indiquent que les cellules aberrantes présentent une accumulation de pré-BCR ainsi que du récepteur kit à leur surface (**Fig 1C**).

Tel que décrit dans mon introduction, le pré-BCR et le récepteur Kit sont incriminés dans des mécanismes de polarisation chez les progéniteurs B (Rossi et al. 2006) et les CSHs, respectivement (Hao et al. 2021). Cette polarisation est essentielle pour les mécanismes de divisions asymétriques visualisés dans les CSHs et les lymphocytes B. Le niveau d'expression de kit et du pré-BCR à la surface des cellules aberrantes corrèle fortement ( $R^2 > 0,9$ ). L'expansion des cellules aberrantes PAX5-ELN est associée à la surexpression de gènes codant des intégrines telles que Itga4, Itga2, Itgb2, Itgb4... Enfin, les pré-CSLs quiescentes sont enrichies pour l'expression des protéines de répartition asymétrique Cdc42 et Taz tandis que les cellules pré-leucémiques proliférantes possèdent une activité Myc augmentée. Au vu de la littérature sur la polarisation cellulaire, ces résultats suggèrent que les cellules aberrantes pourraient être capables de se polariser grâce au pré-BCR et ce, en présence de kit, ce qui n'est normalement pas possible dans la lymphopoïèse B normale. La question ici est : est-ce qu'un mécanisme de division asymétrique pourrait favoriser l'auto-renouvellement et de façon concomitante, maintenir la quiescence cellulaire ?

Pour valider cette hypothèse je proposerais d'utiliser les souris H2B-GFP pour comparer la répartition du Cdc42, de Taz et de Myc dans les pré-CSLs quiescentes et les cellules pré-leucémiques proliférantes par immunofluorescence. Cette approche pourrait être combinée à des analyses de vidéo-microscopie, afin de suivre l'agrégation de kit et du pré-BCR à la membrane pour valider leur implication dans la polarisation cellulaire. Pour cela, des conditions de cultures optimisées devront être utilisées afin de reproduire les interactions physiologiques entre les cellules du micro-environnement et les pré-CSLs. Afin de reproduire ces interactions, je proposerais d'essayer tout d'abord des conditions de co-culture avec des cellules stromales classiques telles que les cellules MS5 ou bien OP9. Ensuite, il pourrait être réalisés des co-cultures sur cellules issus du micro-environnement de la moelle osseuse de souris PAX5-ELN capables de sécréter de l'IL7 et du Kitl: Osteo-CAR (Cd45<sup>-</sup>, Lin&Cd71<sup>-</sup>, Cd31&Cd144<sup>low/neg</sup>, Sca<sup>-</sup>, CD249<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, Cd61<sup>high</sup>), Adipo-CAR (Cd45<sup>-</sup>, Lin&Cd71<sup>-</sup>, Cd31&Cd144<sup>low/neg</sup>, Sca<sup>-</sup>, CD249<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, Cd61<sup>low</sup>), et MSC (Cd45<sup>-</sup>, Lin&Cd71<sup>-</sup>, CD31&CD144<sup>neg</sup>, Sca<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, NG2<sup>+</sup>, Cd61<sup>high</sup>) (Baccin et al. 2020; Balzano et al. 2019). En effet, ce type d'approches permettrait d'identifier des spécificités d'interactions cellule-cellule requises pour les mécanismes de division asymétrique des pré-CSLs quiescentes et préciserait

la niche hématopoïétique responsable de ce gain de fonction. Des coupes de moelle osseuse pour visualiser *in vivo* cette dépendance du micro-environnement seraient également pertinentes. Il sera possible de réutiliser des protocoles que j'ai mis en place pendant ma thèse pour étudier le micro-environnement médullaire (Figure 51). Toujours par l'utilisation des souris H2B-GFP, un marquage DAPI, Lin (Gr1, Cd3, Ter119, Cd11b, Igk1), Cd19, H2B-GFP, Emcn&Sca permettrait de discriminer les niches des pré-CSLs quiescentes et celles des cellules pré-leucémiques proliférantes. Pour affiner cette analyse, il serait possible de réaliser des approches d'immunofluorescence par round tel que le permet le protocole IBEX (Radtke et al. 2020; Radtke et al. 2022). Cette approche rend possible l'acquisition de jusqu'à 40 marqueurs sur la même coupe. Il s'agit de l'analyse successive d'anticorps couplés à des fluorochromes que l'on photoblanchit après chaque round d'acquisition (Figure 51). Seul le marqueur nucléaire persiste malgré le photoblanchiment et sert de référence pour aligner les images de l'ensemble des rounds d'acquisition. L'avantage de cette approche, comparativement à la microscopie de masse créée par le laboratoire de Nolan, est qu'elle est utilisable sur n'importe quel microscope à immunofluorescence avec des anticorps non propriétaires.

#### Bone marrow of PE<sup>tg</sup> pre-leukemic mouse

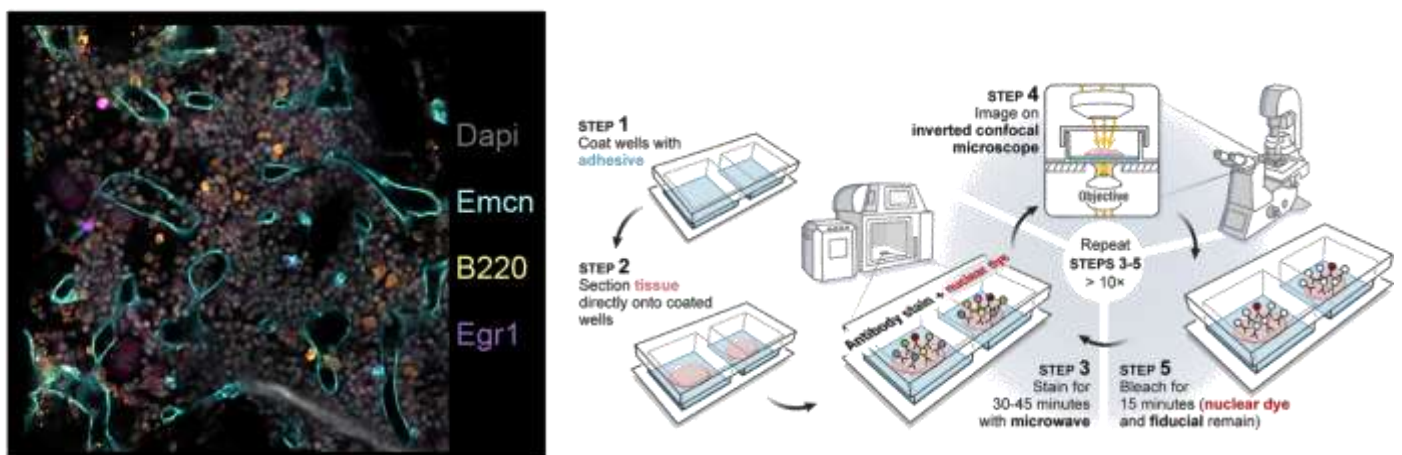


Figure 51 : Image d'une coupe de moelle osseuse de souris pré-leucémique PAX5-ELN acquise par immunofluorescence (*panel de gauche*). Schéma représentatif de la stratégie IBEX d'immunofluorescence par round permettant l'acquisition sur une même coupe de plusieurs dizaines de marqueurs (*panel de droite*).

Après l'observation de ce mécanisme de polarisation dans les processus de division asymétrique des pré-CSLs, je propose de confirmer son rôle dans le maintien de l'activité des pré-CSLs. Pour cela, le croisement de nos souris PE<sup>tg</sup> avec des souris Lambda5<sup>-/-</sup> ou non crosslinkable permettrait d'observer l'effet de l'absence d'agrégation du pré-BCR au stade pré-

leucémique *in vivo* et de déterminer si la fonction d'auto-renouvellement et d'initiation leucémique est altérée.

### **Le stress oncogénique induit-il une addiction aux signaux pro-survies**

Mes résultats indiquent que la mise en place d'un phénotype aberrant est associée à la dérégulation de certaines signalisations clés de la différenciation B. En effet, en combinant des approches de phospho-protéomique et de transcriptomique, mes données indiquent que la suractivation de la voie STAT5, normalement réprimée par l'axe pro-différenciation du pré-BCR, participe à la perturbation de la différenciation B (**Fig 3**). Le pouvoir leucémogénique de la voie JAK-STAT est déjà extensivement discuté dans les LAL-B ([Malin, McManus & Busslinger 2010](#)). Cependant, l'addiction des cellules pré-leucémiques pour l'activation de la voie JAK-STAT reste à définir. Dans la différenciation B normale, la voie de signalisation IL7R-STAT5 permet aux cellules pro-B de survivre au stress induit par les réarrangements des IgH. C'est pourquoi je fais l'hypothèse que les cellules aberrantes B sont soumises à un stress qui les rend dépendantes à la signalisation pro-survie JAK-SAT. Cette hypothèse s'appuie sur l'observation d'un niveau d'apoptose important dans les cellules aberrantes, associé à une baisse de l'expression global de B220 et de CD45. Les protéines B220 et CD45 sont deux isoformes codées par le gène *PTPRC*. Il s'agit de phosphatases ayant de très nombreuses cibles cytoplasmiques. Elles participent à définir un seuil minimal de phosphorylation à atteindre pour induire efficacement une cascade de signalisation. Il est notamment reporté que le CD45 est un régulateur négatif de la voie JAK/STAT ([Tchilian & Beverley 2006](#)) ainsi que de la tyrosine kinase LYN ([Katagiri et al. 1999](#)). Le niveau de CD45 est très différent entre des CSHs et des cellules hématopoïétiques matures (Lymphocytes T ou B recirculant). Ceci suggère que la plasticité cellulaire des CSHs, qui leur permet de répondre à grande diversité de stimuli, est dépendante en parti du niveau de CD45 exprimé par la cellule. Lors d'un stress cellulaire telle que l'irradiation, j'ai pu observer que l'apoptose induite dans les lymphocytes B était associée à une diminution d'expression de B220. Plus précisément, dans des souris WT, les progéniteurs B apoptotiques présentent un niveau d'expression de B220 similaire à celui des cellules aberrantes B de souris pré-leucémiques. Ces résultats suggèrent qu'un stress est induit dans les cellules exprimant l'oncogène, comme on peut l'observer lors de l'irradiation d'une cellules B normale. De plus, les cellules aberrantes PAX5-ELN activent STAT5 à un niveau comparable (voire plus élevé) de celui des cellules pro-B (niveau maximum physiologique de pSTAT5 observé). Le stade de différenciation pro-B est celui dans lequel l'expression de l'oncogène *PAX5-ELN* débute ([Jamrog et al. 2018](#)). De plus, la culture des progéniteurs B aberrants en

absence d'IL7, ou avec une faible dose, induit une forte mortalité cellulaire par apoptose des cellules aberrantes. Mis ensemble, ces observations m'amènent à l'hypothèse que la signalisation induite par STAT5 est cruciale pour les cellules aberrantes, afin de survivre au stress induit par l'oncogène. Il ne subsisterait alors en présence de l'oncogène que les cellules dans lesquelles la signalisation IL7R-STAT5 est la plus élevée. Ceci explique probablement pourquoi un faible niveau d'expression des phosphatases B220 et CD45, qui contrôlent le seuil d'activabilité de la voie JAK/STAT, est retrouvée dans les cellules aberrantes.

Afin de valider expérimentalement cette hypothèse, je propose de traiter à différentes doses d'inhibiteurs de la voie JAK/STAT (Dasatinib et Tofacitinib) ou d'anticorps anti-IL7 des souris pré-leucémiques afin d'observer comment le traitement impacte la population pré-leucémique. Cependant, la mise en place des cellules aberrantes a lieu probablement dès la période embryonnaire. C'est pourquoi il serait difficile en traitant des souris jeunes de différencier, (1) un effet sur la mise en place même de la population pré-leucémique, (2) d'un effet sur une population pré-leucémique pré-existante. Une autre approche expérimentale permettrait de s'affranchir de cette problématique. En effet, la transplantation de LSK PE<sup>tg</sup> dans des souris receveuses traitées avec des inhibiteurs de JAK ou des anticorps anti-IL7 serait pertinente. Elle permettrait de trancher sur l'importance de la voie IL7R STAT5 dans la genèse et le maintien de la population B pré-leucémique nouvellement générées *in vivo* à partir des LSK PE<sup>tg</sup> transplantées. Il sera néanmoins important de trouver une dose de drogue adaptée. En effet, une trop forte dose d'inhibiteur mimant l'absence de la signalisation IL7r-STAT5, pourrait aussi empêcher la mise en place de la lymphopoïèse B complète (von Freuden-Jeffry et al. 1995; Corcoran et al. 1998). L'idéal serait donc d'utiliser plusieurs doses afin d'en discriminer une qui pourrait impacter la population pré-leucémique sans bloquer la différenciation B normale.

### **Contrebalancer la signalisation JAK/STAT par l'intermédiaire de BLNK**

La balance signalétique entre la voie JAK-STAT et celle du pré-BCR implique de très nombreux acteurs moléculaires permettant de réguler finement l'avancée de la différenciation B. La protéine adaptatrice BLNK y joue un rôle majeur, de par son implication dans une cascade de signalisation favorisant la modification du paysage signalétique de la cellule (Ochiai et al. 2012). Il est intéressant de noter que BLNK est presque complètement absent de l'ensemble des cellules aberrantes B, que ce soit au niveau transcriptionnelle, protéique ou phosphoprotéique (**Fig 3B, 3E**). Il ne peut donc pas jouer son rôle de répresseur de la signalisation JAK/STAT dans les cellules pré-leucémiques PAX5-ELN (**Fig 3A**). De plus, il

est décrit dans la littérature que les modèles murins délétés pour BLNK possèdent une susceptibilité accrue à la transformation (Nakayama et al. 2009). Ce constat soulève la question du rôle de BLNK dans la leucémogénèse de notre modèle. Pour y répondre, il serait possible de réaliser un « sauvetage » de l'expression de BLNK dans des cellules aberrantes. Ceci permettrait de déterminer si l'expression de BLNK est suffisante pour induire la mort cellulaire ou restaurer le processus de différenciation B. Pour cela, la transduction de LSK avec un lentivirus permettant l'expression de BLNK sous le contrôle d'un promoteur B spécifique pourrait être réalisée. Une seconde approche serait de transduire directement des cellules aberrantes avec des lentivirus permettant l'expression de BLNK.

### **Détournement de la signalisation STAT5 en contexte de quiescence ?**

Mes résultats indiquent une activation globale de STAT5 dans les cellules aberrantes B pré-leucémiques, qu'elles soient proliférantes ou quiescentes. Il est intéressant de noter que ce pattern d'activation n'est pas retrouvé dans la lymphopoïèse B normale, où toutes les cellules activant STAT5 se trouvent dans le cycle cellulaire (**Fig 3C**). Ce constat amène à la question suivante : une même signalisation peut-elle induire un programme moléculaire différent dans une cellule suivant son état dans le cycle cellulaire ? Comme il est reporté que STAT5 permet aux CSHs de retourner en quiescence et d'amener à la dormance après un stress aigu (Venezia et al. 2004; Wang et al. 2009), est-il possible d'imaginer que certaines cibles de STAT5 soient spécifiquement régulées dans les pré-CSLs quiescentes ? Pour répondre à cette question, des expériences de CUT&TAG de STAT5, combinées à des CUT&TAG de marques activatrices (H3K4, H3K27<sup>ac</sup>) et inhibitrices (H3K27<sup>me3</sup>, H3K9<sup>me2/me3</sup>) pourraient être réalisées sur des CSHs actives (MPP1 : LSK CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>) et dormantes (LT-HSC : LSK CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>). Ce profil pourrait ensuite être confronté à celui de cellules pré-leucémiques actives (H2B-GFP<sup>low</sup>) et quiescentes (H2B-GFP<sup>high</sup>) afin de discriminer le réseau de régulation transcriptionnelle de STAT5 spécifiquement activé dans des cellules quiescentes.

### **La transformation leucémique est-elle dépendante d'un « priming » signalétique ?**

Aussi, il est intéressant de constater que les pré-CSLs quiescentes, en plus de la signalisation STAT5, semble élargir leur réactivité à d'autres voies telles que les voies dépendantes de ERK et de STAT3. Or, dans la différenciation normale, la voie de signalisation I17R STAT5 est exclusive de la voie ERK-STAT3. Mes analyses transcriptionnelles indiquent que les cellules H2B-GFP<sup>high</sup> présentent une expression augmentée d'une large diversité de récepteur cytokinique (Cxcr4, Il6r, Il10ra, Pdgfra, Il2ra, Il4ra ...) ce qui suggèrent qu'elles sont

capables de répondre à une plus grande pluralité de signaux. Le fait d'identifier une très large diversité de signaux activables dans les pré-CSLs, cellules à l'origine de la leucémie, pourrait suggérer que cette sensibilité joue un rôle dans la susceptibilité à la transformation. Cependant, une fois transformées, les cellules leucémiques privilégient l'activation soit de la voie JAK-STAT, soit de la voie RAS/MAPK par l'acquisition d'évènements secondaires (Chan et al. 2020). Cela amène à la question suivante : un signal doit-il préexister au stade pré-leucémique afin d'être sélectionné par une mutation secondaire ? Pour valider cette hypothèse, des traitements *in vivo* au stade pré-leucémique par des inhibiteurs de la voie RAS ou STAT5 pourraient être utilisés afin de déterminer s'ils réduisent l'acquisition des évènements secondaires associés. Une autre stratégie pourrait être de croiser des modèles transgéniques de souris hétérozygotes Stat5<sup>+/-</sup> ou Ras<sup>+/-</sup>, avec nos souris PE<sup>tg</sup> et d'analyser l'incidence sur l'acquisition et l'identité des mutations secondaires.

### **Concomitance des processus de différenciation et de reprogrammation ?**

La plasticité cellulaire est un processus fortement étudié dans les iPSCs ainsi que dans les CSHs. Cependant, l'implication de la plasticité cellulaire dans la leucémogénèse n'est actuellement que peu adressée. Quelques études font figure d'exception en s'intéressant notamment aux « Mixed-Phenotype Acute Leukemia » (MPAL), un type de leucémies possédant conjointement des marqueurs retrouvés dans les LAL et les LAM. Les études portant sur cette pathologie indiquent que l'évènement primaire associé à un contexte cellulaire spécifique peut induire un processus d'infidélité de lignage (Alexander et al. 2018). Mon approche d'ATAC-seq révèle une baisse d'activité transcriptionnelle de PAX5 et de EBF1 dans les pré-CSLs quiescentes (Fig 4G, S4D). Ces deux facteurs de transcription sont considérés comme des régulateurs clés du maintien de l'identité B, comme le prouve les expériences de transdifférenciation permise en absence de PAX5 dans des progéniteurs B (Nutt et al. 1999). Mes résultats suggèrent donc que la présence de l'oncogène *PAX5-ELN* mime en partie une absence de PAX5 dans les cellules quiescentes. Plus précisément, l'activité de répression transcriptionnelle de PAX5 semble particulièrement atteinte. En effet, mes résultats indiquent un enrichissement des cibles physiologiquement réprimées par PAX5 dans les pré-CSLs quiescentes (H2B-GFP<sup>high</sup>) (Fig 4H, S4E).

Ces résultats sont renforcés par l'analyse des régions différentiellement accessibles (ATAC-seq) et des gènes différentiellement exprimés (RNA-seq) entre les pré-CSLs quiescentes (H2B-GFP<sup>high</sup>) et les cellules pré-leucémiques actives (H2B-GFP<sup>low</sup>). Mon approche a tout d'abord consisté à extraire les données d'ATAC-seq et de RNA-seq issues des

différents compartiments de la différenciation normale (allant de LT-HSC aux cellules immature B). Puis les « peaks » (ATAC-seq) et les gènes (RNA-seq) différentiellement exprimés entre les cellules H2B-GFP<sup>high</sup> et H2B-GFP<sup>low</sup> ont été « clustérisés » suivant leur signal dans la différenciation normale (**Fig 5A-C**).

Cette analyse révèle que les régions ouvertes de la chromatine de progéniteurs B (exprimant PAX5) sont enrichies dans les cellules pré-leucémiques actives (H2B-GFP<sup>low</sup>, **Fig 5B**). En revanche, ce sont les régions ouvertes des populations « MLP » et « HSPCs » (qui n'expriment pas PAX5) qui sont fortement représentées dans les pré-CSLs quiescentes (H2B-GFP<sup>high</sup>, **Fig 5B**). Il y aurait donc, dans les pré-CSLs quiescentes, un environnement favorisant une perte d'activité répressive de facteurs d'identité B tel que PAX5 et de façon concomitante, un gain d'activité pour des facteurs d'immaturité tels que Spi1 et Runx1 (**Fig 4G**). De plus, les données RNA-seq indiquent que les pré-CSLs quiescentes sont enrichies en clusters de gènes fortement exprimés dans les HSPCs et les MLP (**Fig 5C**), confirmant au niveau transcriptionnel, une plasticité et une reprogrammation moléculaire (du moins partielle) des cellules initiatrices de la leucémie.

De plus, de façon contre intuitive, mes données d'ATAC-seq et de RNAseq indiquent que dans un même temps : les pré-CSLs quiescentes (H2B-GFP<sup>high</sup>) possèdent une signature de cellules B plus différenciée (cluster Immature-B<sup>like</sup>, **Fig 5C**) combinées aux signatures d'immaturité (clusters MLP<sup>like</sup>, HSPC<sup>like</sup>, **Fig 5C**). La réminiscence de la différenciation B normale visualisée au niveau phénotypique chez les cellules aberrantes PAX5-ELN (**Fig 1A**) semble donc aussi se vérifier au niveau transcriptionnel, et place les pré-CSLs quiescentes plus loin dans le processus de différenciation que les cellules pré-leucémiques proliférantes. L'utilisation de données « single cell RNA-seq » pourrait permettre d'avoir un meilleur aperçu de la concomitance des mécanismes de reprogrammation et de différenciation observés au sein de la population pré-leucémique quiescente. En effet, une expérience de ScRNA-seq sur des souris pré-leucémiques PE<sup>tg</sup> permettrait d'évaluer sur le plan transcriptionnel, les trajectoires développementales existant au sein de la population pré-leucémique. Ce type d'approche est réalisable grâce à l'utilisation d'algorithmes tel que Monocle ([Cao et al. 2019](#)), VIA ([Stassen et al. 2021](#)) ou Cellrank ([Lange et al. 2022](#)). Pour répondre à ma question il serait possible d'utiliser les données que j'ai déjà généré en bulk pour spécifier des variables d'intérêts (Cluster HSPC<sup>like</sup> et MLP<sup>like</sup>) qui correspondrait à une trajectoire de reprogrammation (Variable1 : Pseudotime<sup>HSPC-MLP</sup>). Cette trajectoire de reprogrammation serait comparée à la trajectoire de la lymphopoïèse B physiologique (Variable2 : Pseudotime<sup>B-differentiation</sup>) appliquée aux cellules

aberrantes. Cette approche me permettrait de valider si la reprogrammation est liée à un stade de la différenciation B spécifique ou si celle-ci possède une trajectoire développemental indépendante.

Cependant, il est possible que le ScRNA-seq seul ne suffise pas à modéliser correctement les variables qui nous intéressent. Comme exemplifié par mes analyses intégratives d'ATAC-seq et de RNA-seq, certains patterns de reprogrammation /différenciation /quiescence sont visibles uniquement au niveau épigénétique ou transcriptionnel. C'est pourquoi je propose comme alternative d'utiliser des approches combinant pour chaque cellule l'acquisition de leur profil d'expression transcriptionnel et d'accessibilité à la chromatine. Pour cela, il existe différentes techniques dont le Share-seq développé par l'équipe de Buenrostro (Ma, Zhang, et al. 2020) ainsi que son alternative à faible coût le ISSAAC-seq (Xu et al. 2022). Ces approches ont permis de mettre en évidence des états intermédiaires entre le moment où la chromatine est ouverte pour le locus d'un gène, et le moment où son expression débute (Figure 52). Buenrostro assimile ce phénomène à un « priming » épigénétique permettant la mise en place ultérieure d'un programme transcriptionnel. Cette notion est à mettre en regard avec les mécanismes de plasticité cellulaire (Ma, Cao, et al. 2022) ou de mémoire épigénétique permettant aux cellules immunitaires ainsi qu'aux CSHs de répondre plus efficacement à un stimuli déjà rencontré (Laval et al. 2020). Au vu de mes résultats, il serait intéressant d'utiliser ces techniques afin d'adresser ainsi la question du priming épigénétique induit par l'oncogène.

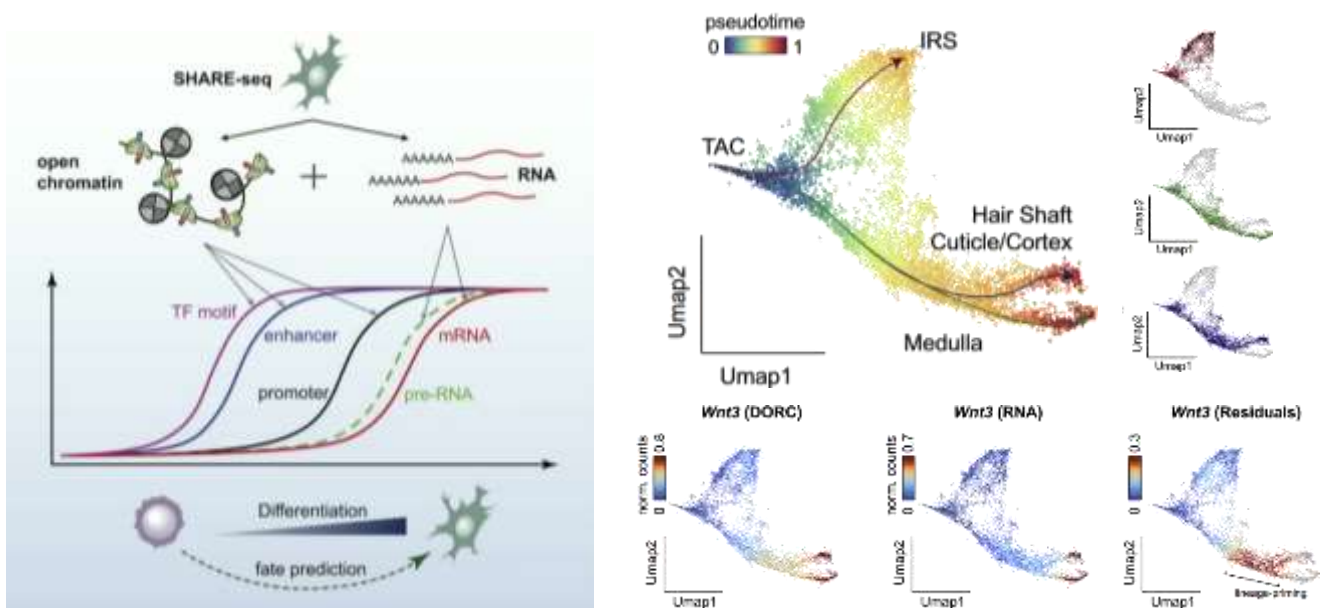




Figure 52 : Schéma représentatif de l'approche Share-seq combinant ATAC-seq et RNA-seq. Modèle des différentes variables aboutissant à l'expression génique (*Panel de gauche*). UMAP représentatif du processus de la différenciation prenant place dans le follicule pileux comportant trois différentes branches. Quantification du signal d'ouverture du locus de *Wnt3*, de son expression génique et du « temps résiduel » entre l'ouverture et la mise en place de l'expression (*Panel de droite*). (D'après [Ma, Zhang, et al. 2020](#))

### **Quiescence cellulaire : induite par l'oncogène, la différenciation ou conjointement ?**

Enfin, la dernière variable visualisée par mon approche intégrative est celle de la quiescence/prolifération cellulaire. Mes analyses prédictives indiquent une relative indépendance de la signature de quiescence par l'intermédiaire de TFs tel que *Egr1*, *Atf3*, *Klf6* et *Mnt* (**Fig 5D**). Cependant, ma prédiction indique dans un même temps que de nombreux TFs sont impliqués dans la régulation du cluster de quiescence cellulaire conjointement avec les clusters *HSPC<sup>like</sup>*, *MLP<sup>like</sup>* et *immature-B<sup>like</sup>* (**Fig 5D**). De plus, il est reporté qu'un certain niveau de quiescence est induit dans la lymphopoïèse B normale à partir du stade pré-BII tardif. On peut alors se poser la question si la quiescence cellulaire des pré-LSCs est liée ou non au processus de différenciation B. En effet, si l'état de quiescence cellulaire est important pour la leucémogénèse, la cellule pré-leucémique pourrait utiliser à son avantage les différents niveaux de quiescence qui préexiste au sein de la lymphopoïèse B normale. Ceci pourrait expliquer pourquoi les pré-CSLs PAX5-ELN possèdent un programme moléculaire plus proche de pré-BII tardives voir d'immatures-B (**Fig 5 B,C**), cellules les plus quiescentes de la lymphopoïèse B. L'approche de « pseudotime » précédemment évoquée pourrait répondre à cette question afin de discriminer si un programme de quiescence (Variable3 : Pseudotime<sup>cell-quiescence</sup>) se met en place au préalable de celui initié dans la différenciation à partir des stades pré-BII tardives et immature B.

### **Etude des relations entre inflammation, quiescence cellulaire et pouvoir leucémogène.**

Parmi les axes moléculaires et les facteurs de transcription dérégulés dans les pré-CSLs quiescentes, ceux impliqués dans le processus d'inflammation semblent particulièrement intéressants. En effet, depuis la découverte de l'acquisition *in utero* de l'altération génétique primaire des LAL-B, l'équipe de Mel Greaves a développé tout un champ d'étude autour de la susceptibilité d'acquiescence des événements secondaires liée à l'inflammation ([Greaves 2018](#)). Les dernières études challengent ce concept jusqu'à la possible prévention du développement leucémique par une alimentation spécifique, en stimulant le microbiome des nourrissons ([Greaves et al. 2021](#)). Mes résultats suggèrent qu'un programme moléculaire pro-

inflammatoire, ou propice à répondre à l'inflammation, s'établit dans les pré-CSLs quiescentes PAX5-ELN. L'intégration de mes données d'ATAC-seq et de RNA-seq indique que cette signalisation est régulée par l'activité de facteurs de transcription tels que Jun, Fos et certains Irf (**Fig 4 G**). Dans la littérature, il est décrit qu'en réponse à un stress inflammatoire, la voie MAPK-ERK est capable d'induire l'activité de Jun et Fos qui initie alors la transcription de EGR1. EGR1 quant à lui, aurait une activité pro-inflammatoire dans la cellule en coréglant des cibles de Nfkb ([Pang et al. 2019](#)). Or, la voie MAPK-ERK est fortement enrichie au même titre que l'activité du facteur de transcription EGR1 dans les pré-CSLs quiescentes.

Ainsi, l'existence de ce priming inflammatoire dans les pré-CSLs et son importance dans la leucémogénèse pourrait être adressés par le traitement de souris pré-leucémiques avec des agents pro-inflammatoires tels que le LPS ou le poli-IPC. L'objectif serait ici de déterminer si ces traitements sont capables d'accélérer la transformation dans notre modèle ainsi que de visualiser leurs impacts sur le phénotype et la fonction des cellules pré-leucémiques.

### **Spécificité des propriétés des cellules souches ?**

Il existe dans l'organisme différents niveaux de quiescence, qui à partir d'un certain seuil peuvent être considérés comme de la dormance cellulaire. Cette dormance est la conséquence simultanée de l'inhibition de voies de signalisation pro-prolifératives et de l'activation de gènes liés à la quiescence cellulaire. Ceci est particulièrement visible au sein de mon analyse intégrative, par la discrimination des clusters opposés de quiescence et de cycle cellulaire (**Fig 5 B-D**). En cela, mes résultats indiquent que la quiescence cellulaire observée au sein des pré-CSLs présente des similarités avec celle s'établissant au sein des CSHs (**Fig 4J**), mais aussi au sein des cellules immatures-B. Ces similitudes suggèrent qu'indépendamment de l'identité de la population cellulaire, un même programme moléculaire est capable d'aboutir à la quiescence cellulaire. Il n'est en effet pas aberrant d'imaginer que si des mécanismes moléculaires sont efficaces pour induire la quiescence dans les CSHs, ces mêmes mécanismes soient également efficaces dans d'autres contextes cellulaires. D'autres exemples sont donnés dans la littérature de la possession de propriétés considérées comme souche par des cellules plus avancées dans la différenciation, que cela soit de l'auto-renouvellement ([Soerens et al. 2023](#); [Sieweke & Allen 2013](#)), de la division asymétrique ([Barnett et al. 2012](#); [Borsa et al. 2021](#)), ou bien de la quiescence cellulaire ([Zhang et al. 2018](#); [Chapman et al. 2020](#)). Mis ensemble, ces notions me font me questionner sur la considération de ce que l'on nomme des propriétés souches et sur la possibilité d'avoir une vision plus « capacité centré » que « cellulaire centré » quant à la fonctionnalité d'une cellule.

## Ciblage thérapeutique de la quiescence cellulaire des pré-CSLs/cellules résistantes

Mes analyses de prédiction de réseau de régulation transcriptionnel incriminent EGR1 comme régulateur clé de la quiescence cellulaire, résultats corroborés par d'autres études dans différents contextes cellulaires (Min et al. 2008; Baek et al. 2022; Stoddart et al. 2022). Ce facteur de transcription semble capable dans un même temps d'induire des gènes pro-quiescences et de réprimer des gènes pro-prolifératifs (Fig 5C-D). La régulation de ses cibles transcriptionnelles est prédite dans mon analyse comme non-associée aux mécanismes de différenciation et reprogrammation (Fig 5D). Ce constat est particulièrement intéressant si l'objectif est d'identifier une cible thérapeutique spécifique des mécanismes de quiescence cellulaire indépendamment du contexte cellulaire. En effet, la quiescence cellulaire est une cause importante de la mauvaise réponse aux chimiothérapies ainsi que de la rechute des patients atteints de LAL (Ebinger et al. 2016; Heydt et al. 2021). C'est pourquoi, mon analyse associant EGR1 au mauvais pronostic des patients atteints de LAL-B, quel que soit leur sous-type oncogénique, me paraît être particulièrement intéressante (Fig 6L).

Cependant, mes analyses reposent essentiellement sur des approches prédictives, qui aussi fiable soient elles, nécessitent une validation. C'est pourquoi il serait possible de réaliser l'édition de *Egr1* en CRISPR-Cas9 afin de déléter le gène dans des LSK PE<sup>lg</sup>. La transplantation de ces cellules dans des souris receveuses nous permettrait de déterminer le rôle de *Erg1* sur la génération de pré-CSLs quiescentes et sur la résistance des cellules aberrantes aux chimiothérapies *in vivo*. Enfin, une validation sur des cellules de LAL-B issues de patients dans lesquelles l'expression de EGR1 aura été inhibée serait également très pertinente. Des expériences de transplantation des cellules modifiées en souris immunodéficientes (NSG), couplées à des traitements de chimiothérapie tel que réalisé en Fig 6 C-H, viendraient aussi conforter l'implication de EGR1 dans les phénomènes de chimiorésistance des LAL-B humaines.

En clinique, l'utilisation de thérapies ciblant des facteurs de transcription reste marginale. Le traitement des LAM3 ciblant l'oncogène PML-RARA à l'aide d'acide tout-trans rétinoïque (ATRA) et de trioxyde d'arsenic prouve la pertinence de cibler des facteurs de transcription oncogénique par l'amélioration considérable du pronostic clinique de cette pathologie (de Thé et al. 1990; Lallemand-Breitenbach et al. 1999). La rareté de ce type de traitement s'explique par la difficulté à cibler l'action des TFs. Cependant, de nouvelles technologies soulèvent des possibilités à cet égard. L'équipe de Benjamin Ebert s'intéresse notamment à des composés capables d'induire l'interaction de facteurs de transcription avec

des ubiquitines E3 ligases afin d'induire spécifiquement leur dégradation (Teng et al. 2022; Koochaki et al. 2022). Il s'agit de molécules connues à l'origine en tant qu'immunomodulateurs et utilisées dans le traitement des myélomes multiples. Leur processus d'action a été récemment compris comme servant de « glue moléculaire » entre des doigts de zinc C2H2 de TFs et l'ubiquitine ligase E3 CRL4. Une autre approche de chimie de synthèse permet de créer des composés chimiques capables de reconnaître spécifiquement des séquences d'ADN, et donc potentiellement de bloquer l'action de TFs (Liu et al. 2012). L'utilisation de cette approche a permis de générer des diamidines hétérocycliques capables de cibler le motif de reconnaissance de PU1 afin de modifier et d'empêcher son interaction avec l'ADN (Antony-Debré et al. 2017). Cette technologie pourrait être adaptée à notre question afin de savoir si EGR1 peut être ciblé thérapeutiquement chez les patients atteints de LAL-B.

Afin de démontrer l'intérêt de ce type de stratégie, il nous faudrait tout d'abord modéliser un composé capable de perturber l'interaction entre l'ADN et EGR1. Ensuite, une validation sur des lignées humaines, ainsi que sur des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon, serait nécessaire afin de comprendre comment le composé inhibe/modifie l'interaction de EGR1 et de l'ADN. Cette étude nécessiterait l'utilisation d'expérience de CUT&TAG et d'ATACseq afin d'analyser l'impact qualitatif (modification du motif) et quantitatif (modification de l'accessibilité) du composé sur EGR1. Après cette validation mécanistique, la transplantation en NSG d'échantillon de LAL-B traitées ou non avec des agents de chimiothérapie, combiné à l'inhibiteur de EGR1, permettrait de connaître l'impact de l'association de ces composées *in vivo*.

### **Concept de la cellule persistante à long terme dans les LAL**

L'étude du vieillissement de tissu hématopoïétique s'est particulièrement développée ces dernières années avec notamment les découvertes liées à l'hématopoïèse clonale. Comme abordé dans l'introduction, au niveau moléculaire, les signatures de vieillissement et d'inflammation chronique dans les CSHs présentent de fortes similitudes. Parmi les gènes les plus associés au vieillissement des CSHs on retrouve *EGR1*, *ATF3*, *KLF6*, *JUN*, *FOS* et *ZFP36* (Héroult et al. 2021; Desterke et al. 2021; Itokawa et al. 2022). Ces gènes sont aussi particulièrement enrichis dans les pré-CSLs quiescentes PAX5-ELN et permettent de prédire le mauvais pronostic chez les patients atteints de LAL-B, indépendamment du sous type oncogénique (Fig 6L et Figure 53). Ces gènes codent uniquement des facteurs de transcription, à l'exception de *Zfp36* qui est un régulateur de la dégradation des ARNm du cycle cellulaire (Galloway et al. 2016). Il est intéressant de noter que *Zfp36* est fortement surexprimé dans les

pré-CSLs quiescentes et qu'il pourrait donc être en partie responsable de la différence d'expression des gènes du cycle cellulaire des cellules pré-leucémiques actives (**Fig. 5B-C**). Ces gènes associés au vieillissement précédemment cités sont connus pour être des gènes de petite taille et finement régulés post-transcriptionnellement. En effet, les ARNm de Jun, Fos, et Egr1 font partie des ARNm les plus rapidement dégradés avec un temps de demi-vie d'à peine quelques minutes ([Golan-Lavi et al. 2017](#)). Leur régulation étant si importante, peut-on imaginer que leur accumulation compromettrait les programmes moléculaires des cellules ? Cette notion est étayée par le fait qu'il est reporté que le vieillissement cellulaire est associé à une accumulation des transcrits des gènes de petite taille en dépit de ceux de longue taille, et que ce biais suffirait à expliquer l'impact moléculaire du vieillissement ([Stoeger et al. 2022](#)).

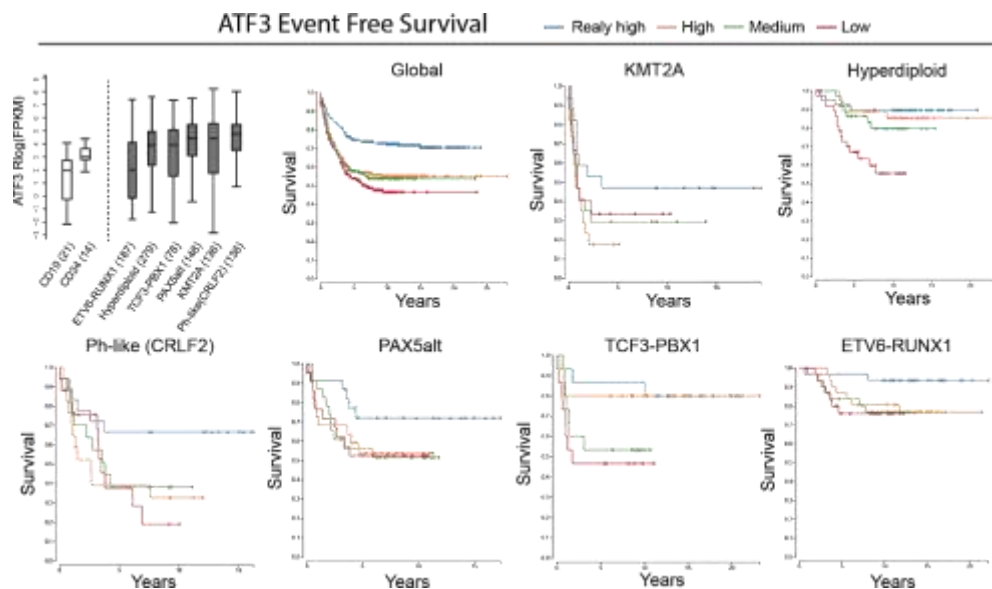


Figure 53 : Boxplot de l'expression d'ATF3 dans différents sous-types oncogéniques (*Panel haut droit*). Courbe de survie sans évènement (EFS) en fonction de l'expression d'ATF3 dans les LAL-B ou pour différents sous types oncogéniques.

Cependant, au vu de mes résultats obtenus chez des souris relativement jeunes, le phénomène de vieillissement est difficilement incriminable. C'est pourquoi j'émet l'hypothèse que la signature de vieillissement observée dans les pré-CSLs quiescentes PAX5-ELN ne serait pas dû à l'âge de la souris, mais plutôt au temps de résidence des cellules dans la moelle osseuse. En effet, nos données indiquent que l'oncogène *PAX5-ELN* altère la différenciation, modifie la cinétique de division des cellules pré-leucémiques et les empêche de sortir de la moelle osseuse. Ainsi, comparativement à un progéniteur B normal, les pré-CSLs quiescentes persistent dans la moelle osseuse pendant un temps bien plus important (**Fig 4B, S4A**). Ceci pourrait expliquer les similarités moléculaires entre les pré-CSLs résidant à long terme dans la moelle (*H2B-GFP<sup>high</sup>*), et les CSHs dans un contexte de vieillissement. Ces notions me questionnent, non pas

sur l'identité du programme moléculaire ayant pris place dans une cellule mais plutôt sur sa durée, sa fréquence et son maintien.

Il est démontré qu'une stimulation chronique des CSHs induit un état de dormance qui est associé à une perte fonctionnelle (auto-renouvellement, capacité de greffe, multipotence) (Bogeska et al. 2022). On qualifie ce mécanisme d'épuisement cellulaire. Il serait donc envisageable qu'un oncogène puisse également induire un stress chronique qui aboutirait à une forme d'épuisement. Les signalisations pro-inflammation visualisées dans les pré-CSLs quiescentes pourraient donc être liées à un mécanisme d'épuisement/vieillessement des cellules qui survivent le plus longtemps en présence de l'oncogène. Chez le patient, mes analyses indiquent que les gènes associés au vieillissement sont très prédictifs du mauvais pronostic, quel que soit le sous-type oncogénique. Ces observations suggèrent que les cellules résistantes aux traitements de chimiothérapies sont celles ayant résidées dans la moelle osseuse le plus longtemps. Ces cellules pourraient donc se définir sous le terme « long-term persisting cells » (LTPCs).

La validation expérimentale de cette hypothèse me paraît être un challenge de tout premier ordre. Il serait possible d'utiliser le modèle H2B-GFP afin d'analyser des pré-CSLs quiescentes (H2B-GFP<sup>high</sup>) à différents âges de la souris (60 – 90 – 120 jours). Ces échantillons pourraient être ensuite séquencés par Sc-RNAseq afin de confirmer que la signature de vieillissement corrèle avec le temps de persistance des pré-CSLs dans la moelle. L'approche en Sc-RNAseq serait nécessaire afin de séparer les pré-CSLs quiescentes nouvellement générées des plus anciennes. Chez l'homme, cette hypothèse pourrait être adressée par l'utilisation d'échantillon de moelle osseuse de patients au diagnostic, pour lesquels des expériences de mitochondrial Sc-ATACseq (Lareau et al. 2021) combinées ou non avec du RNA-seq seraient réalisées. En effet, les mutations de l'ADN mitochondrial adviennent continuellement avec la réplication mitochondriale et le stress oxydant. C'est pourquoi il est montré que l'accumulation des mutations sur l'ADN mitochondriaux est corrélée au vieillissement de la cellule (Stewart & Chinnery 2015). De plus, l'ADN mitochondrial est sujet à 5-10 fois plus de mutations que l'ADN nucléaire. Il est donc possible, grâce au séquençage de l'ADN mitochondrial, de (1) construire un arbre phylogénique de l'évolution clonale des cellules leucémiques (Figure 54) et de (2) calculer la charge mutationnelle de chaque cellule.

A l'aide de ces deux informations, il serait donc possible d'identifier des cellules leucémiques plus précoces dans la leucémogénèse ainsi que de calculer une valeur relative à « l'âge de la cellule » et donc à son temps de persistance dans la moelle. Si mon hypothèse est juste, les activités des facteurs de transcription liées au vieillissement (EGR1, KLF6, JUN, FOS ...) ressortiraient dans la population avec la charge mutationnelle la plus importante. De plus, cette approche permettrait de savoir si les LTPCs possèdent ou non une phylogénie clonale antérieure, et donc si elles sont enrichies en pré-CSLs. Cependant, cette approche présente certaines limites. Tout d'abord il ne nous serait pas possible d'identifier les altérations génétiques initiatrices et transformantes dans l'échantillons. Ces altérations pourront donc être des variables confondantes dans notre analyse et rajouteront un niveau de complexité supplémentaire.

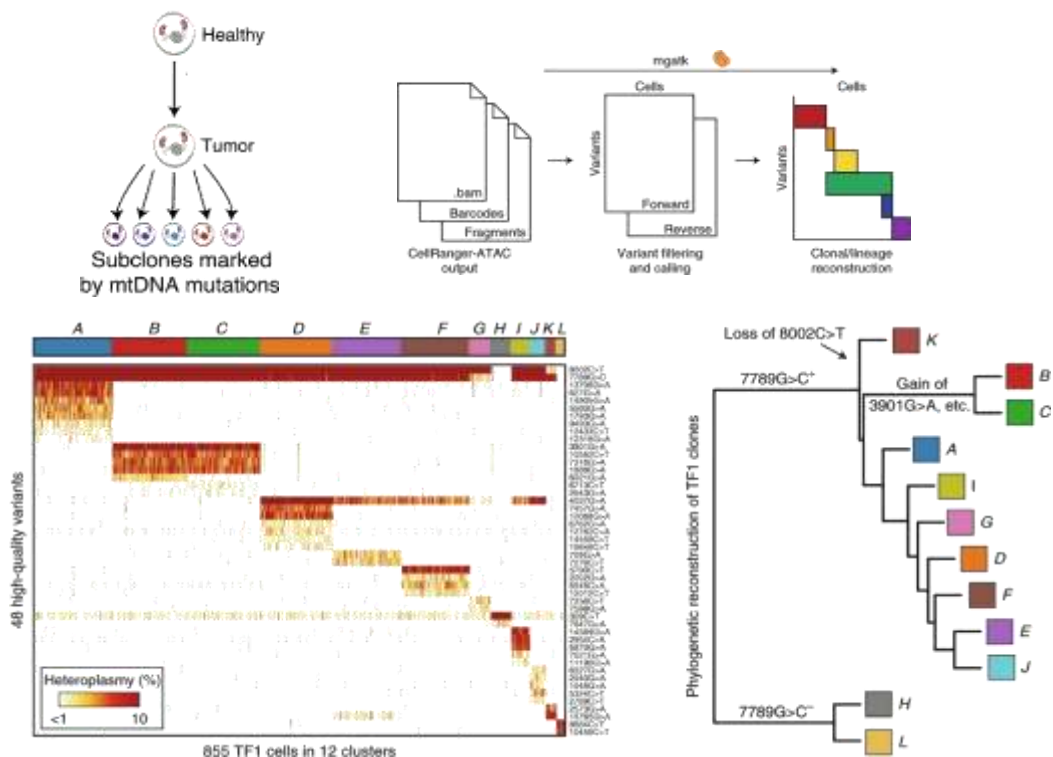


Figure 54 : Schéma décrivant l'approche biologique et informatique du pipeline d'analyse du mtSc-ATAC-seq (*Panel haut*). Heatmap des différents clusters de cellules individualisés par différentes mutations au niveau de l'ADN mitochondriale (*Panel bas gauche*). Représentation de l'arbre phylogénétique calculé à partir des acquisitions successives de mutations mitochondriales (*Panel bas droit*). (D'après [Lareau et al. 2021](#))

Pour contourner ces limites, il serait possible d'utiliser l'approche GoT-ChA mise en place par le laboratoire de Dan Landau qui réalise pour la même cellule de l'ATAC-seq et du séquençage ciblé d'altération au niveau génomique ([Myers et al. 2022](#)). Le GoT-ChA nécessite cependant la connaissance préalable des mutations présentes dans l'échantillons afin de les

cibler, ce qui peut poser problème dans le cas d'échantillons précieux et rare. Enfin, l'approche MutaSeq et mitoClone développée par l'équipe de Simon Haas séquence à la fois l'ADN mitochondrial, génomique et l'ARN d'une même cellule. En utilisant cette approche, son équipe a été capable de discriminer des profils d'expression transcriptionnelle ainsi qu'une hiérarchie clonale et les mutations associées par une seule et même technique ([Velten et al. 2021](#)).



## PERSPECTIVES

### Caractérisation phénotypique des pré-CSLs quiescentes PAX5-ELN

Récemment, j'ai utilisé mes données de transcriptomique confrontée à la « database Immgen » afin d'identifier les marqueurs de surface optimaux pour discriminer la population de pré-CSLs quiescentes (**Fig 6C**). Pour cela j'ai sélectionné des gènes codant des protéines de surfaces correspondant aux clusters HSPCs-like, MLP-like et Immature B-like. Cependant, malgré une 30<sup>aines</sup> de cibles protéiques différentes testées, je n'ai pas réussi à trouver de marqueur de surface complètement spécifique des pré-CSLs quiescentes. Cette approche m'a permis de remarquer que l'expression aberrante des protéines de surface se conforme à deux types de situations différentes. Soit une expression globalement augmentée ou diminuée dans la population aberrante (B220, IL7R, CD45, CD105, CD69). Soit un continuum d'expression associé à la différenciation (CD2, BP1, CD93) ou la quiescence/cycle cellulaire (CD244a, Kit, IgH, Ly6a). J'ai pris avantage de l'hétérogénéité phénotypique des cellules pré-leucémiques qui m'a permis d'enrichir de plus d'un facteur 10 (de 1,5-4% à 28-45%) le compartiment de pré-CSLs quiescente (H2B-GFP<sup>high</sup>) sur le critère phénotypique CD19<sup>+</sup>B220<sup>low</sup>CD93<sup>-</sup>CD244a<sup>+</sup>BP1<sup>-</sup>CD2<sup>+</sup>Ly6a<sup>-</sup> (**Figure 55**). Cette preuve de concept devrait nous permettre à l'avenir un accès facilité à une population enrichie en pré-CSLs quiescentes, sans avoir à utiliser le modèle H2B-GFP.

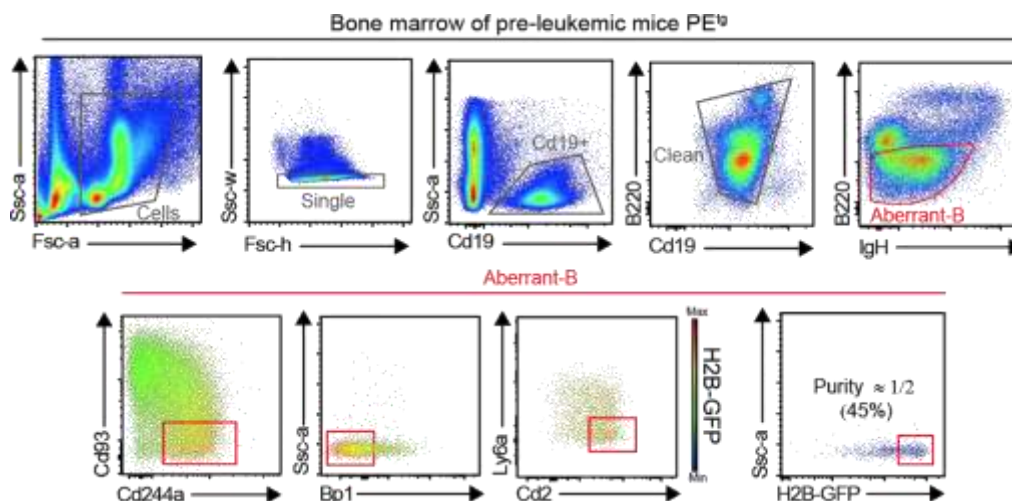


Figure 55 : Stratégie de fenêtrage optimisé afin de purifier les pré-CSLs quiescentes uniquement à partir de marqueurs phénotypiques.

### Criblage de petites molécules pour l'identification de nouvelles thérapies ciblées

Après l'identification et la caractérisation des pré-CSLs quiescentes au sein du modèle PAX5-ELN, une des perspectives les plus intéressantes est la possibilité d'utiliser ce modèle afin de développer de nouvelles thérapies ciblées. Pour cela, nous avons mis en place une

collaboration avec la chimiothèque nationale qui nous a donné accès à une librairie de molécule non « FDA-approved » de 1040 composés chimiques représentant la diversité chimique de la librairie complète (63 199 molécules). Cette librairie nous donne l'opportunité unique de découvrir des effets biologiques de nouvelles molécules non caractérisées. Ce type de stratégie a notamment permis à l'équipe de Guy Sauvageau, grâce au criblage d'une librairie de petites molécules, de découvrir l'UM171, un composé permettant d'amplifier spécifiquement les CSHs en culture (Fares et al. 2014).

C'est pourquoi j'ai tiré profit de la mise en place de la caractérisation phénotypique des cellules pré-leucémiques des souris PAX5-ELN permettant de visualiser par un marquage multiparamétrique unique, la population B aberrante contenant les pré-CSLs et l'ensemble des sous-populations du lignage B normal. J'ai également miniaturisé le système de co-culture sur cellules stromales MS5 permettant de visualiser la lymphopoïèse B pré-leucémique *in vitro*. Je me suis assuré de la reproductibilité de ce système afin qu'il puisse être utilisé dans des conditions de criblage. J'ai ensuite élaboré différents « reads out » statistiques pour être capable de discriminer des différences fines dans chacune des populations observées (Figure 56). Dans ces conditions de culture, il nous est donc possible de tester l'impact de chaque composé sur la viabilité des cellules pré-leucémiques exprimant l'oncogène, et de façon simultanée, celle des sous-populations de la différenciation B normale. Cette approche permet donc d'identifier des composés chimiques candidats pour inhiber efficacement la viabilité et/ou restaurer la différenciation des cellules enrichies en pré-CSLs (Figure 56).

Ces conditions expérimentales, et le criblage des 1040 composés de la chimiothèque nationale (réalisé par Manon Bayet et Mathieu Bouttier, respectivement étudiante en thèse et ingénieur d'étude au laboratoire) ont permis d'identifier 47 premières molécules candidates (« hits ») qui affectent la viabilité des cellules B aberrantes, certaines affectant également l'ensemble des sous-populations B normales (Groupe A, Figure 56). De façon intéressante, notre approche nous a permis d'identifier parmi ces hits des molécules épargnant, voire amplifiant, certaines (Groupes B et D, Figure 56) ou toutes (Groupe C, Figure 56) les sous-populations B normales. Dans l'ensemble, notre travail montre la faisabilité d'un criblage de petites molécules sur une population enrichie en pré-CSLs prenant en compte la complexité intrinsèque des cellules primaires du lignage B tout en considérant leur microenvironnement.

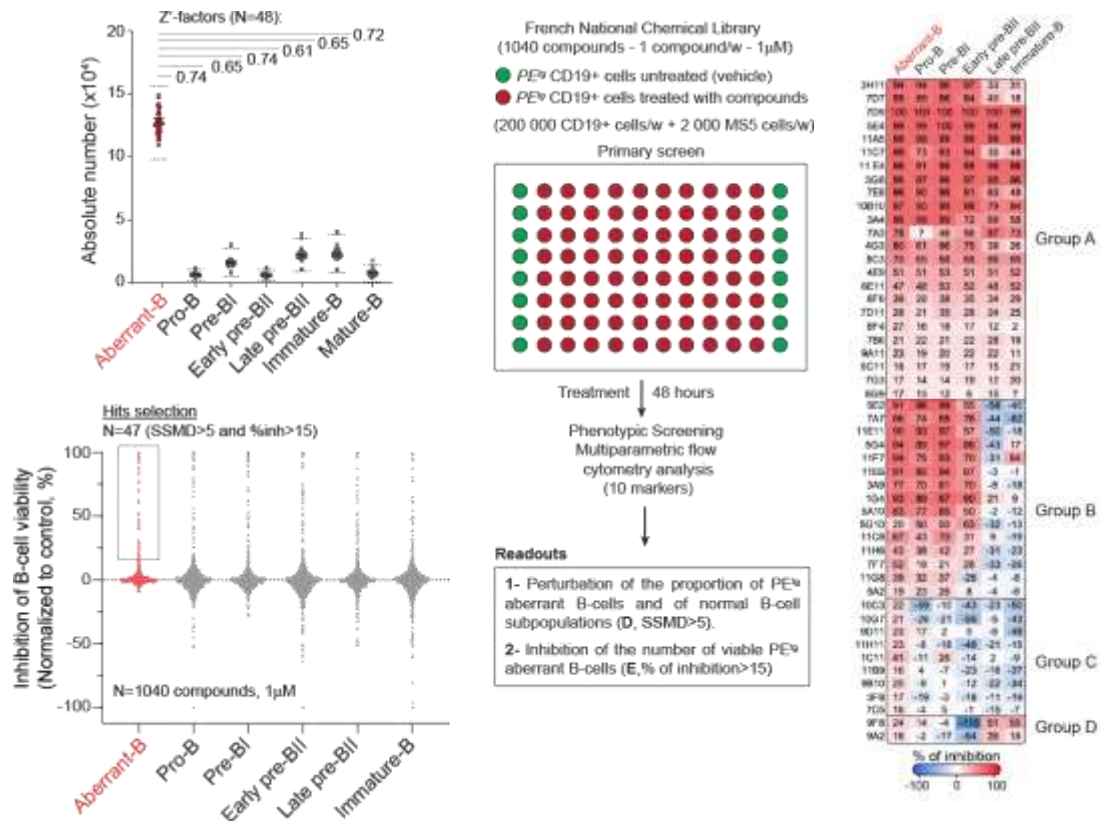


Figure 56 : Validation de la reproductibilité de la miniaturisation en plaque et de l'acquisition des différentes populations par calcul de Z-score (*Panel haut gauche*). Stratégie utilisée pour le crible des 1040 composés de la Librairie chimique nationale française en plaque 96 puits (*Panel central*). Représentation en dot plot de la discrimination des 47 hits de la librairie (*Panel bas gauche*). Clustering en k-means des 47 hits en fonction de leur effet biologique sur les différentes populations de la lymphopoïèse B (*Panel droit*).

### Généralisation des résultats à d'autres modèles murins transgéniques de LAL-B

Mon équipe de recherche travaille à confronter les résultats établis dans le modèle PAX5-ELN à ceux générés à partir d'autres modèles de leucémogénèse. Il est en effet important d'être capable de spécifier expérimentalement ce qui est spécifique du modèle, de ce qui est plus généralisable à l'ensemble des LAL-B. Une première approche implique une autre altération initiatrice de PAX5 nommée PAX5-P80R. Cette altération de PAX5 a été identifiée récemment comme la mutation la plus fréquente de PAX5 dans les LAL-B et comme induisant un programme transcriptionnelle indépendant des autres altérations de PAX5 (Passet et al. 2019; Gu et al. 2019). C'est pourquoi PAX5-P80R représente une altération génétique intéressante à modéliser chez la souris afin de comprendre les premières étapes de l'initiation leucémique de ce sous-type oncogénique, et pour discriminer les similitudes et différences avec le modèle PAX5-ELN. Les résultats obtenus avec la modélisation de l'oncogénèse P80R

indique qu'il induit des capacités d'auto-renouvellement à des progéniteurs B PAX5<sup>-/-</sup>, ainsi qu'une susceptibilité à développer la leucémie. L'analyse transcriptomique des phases leucémiques et pré-leucémiques est en cours de réalisation et nous permettra de valider différents acteurs moléculaires impliqués dans la leucémogénèse P80R (travail de thèse actuellement réalisé par Manon Bayet au laboratoire).

De plus, notre équipe a récemment fait l'acquisition d'un modèle murin transgénique exprimant le transgène *TCF3-PBX1* impliqué dans le développement de LAL-B. Ce sous type oncogénique est retrouvé dans 10% des patients pédiatriques. Il est notamment décrit comme impliquant une augmentation de la signalisation pro-proliférative du pré-BCR dans le développement leucémique indépendante de la signalisation IL7R-STAT5. Ces observations sont intéressantes car elles suggèrent que le processus leucémogène entre les sous-types oncogénique PAX5-Alt et TCF3-PBX1 sont dissemblables. C'est pourquoi la validation de l'existence de processus de quiescence et de reprogrammation dans le modèle TCF3-PBX1 nous permettra de conforter la récurrence de ces processus, quel que soit l'identité de l'oncogène primaire et son mode d'action.

### **Identification des pré-CSLs au stade leucémique chez l'Homme**

Lors de ma dernière année de thèse au laboratoire, je me suis intéressé à valider mes résultats directement sur des échantillons de LAL-B humaine. En effet, j'ai mis en place des tests de prolifération permettant d'identifier des cellules leucémiques quiescentes (label-retening cells « LRCs ») à partir d'échantillons frais ou décongelés de patients au diagnostic (**Fig 6 I-J et Fig S6 H-I**). J'ai aussi mis en place des conditions expérimentales pour la transplantation d'échantillons de LAL-B en PDX. Ces expériences de xénogreffes m'ont permis de créer des modèles de MRD grâce à des traitements de polychimiothérapie de souris NSG leucémiques (**Fig 6C-G et Fig S6 B-F**). Ces approches représentent des outils de validation puissant pour nos hypothèses biologiques obtenues chez la souris. Elles nous permettront de répondre à une question essentielle qui concerne l'identité et l'implication clinique des pré-CSLs chez l'homme. En effet, dans le domaine il existe une dissension sur l'implication de la pré-CSLs dans la rechute et la résistance au traitement. Les travaux récents de l'équipe de Tariq Enver semblent indiquer que le traitement à l'aide de polychimiothérapie n'induit aucunement de sélection clonale ([Turati et al. 2021](#)). Ils observent cependant une uniformisation du profil transcriptionnel et phénotypique vers les cellules les plus quiescentes. De plus, d'autres études décrivent que toutes les cellules leucémiques de LAL-B possèdent la plasticité suffisante pour acquérir un niveau de quiescence permettant de résister aux traitements, et cela, dépendamment

de la niche dans laquelle elles se trouvent (Ebinger et al. 2016). Ces résultats rentrent cependant en contradiction avec les approches comparant le profil mutationnel des cellules leucémiques de mêmes patients au diagnostic et à la rechute (Mullighan et al. 2008; Clappier et al. 2011; Mullighan 2012; Waanders et al. 2020). Ces études démontrent que pour plus de la moitié des patients, les cellules de la rechute ont perdu des altérations présentes au diagnostic et en ont acquis des nouvelles. Ces observations indiquent que dans la majorité des cas, les cellules de la rechute n'ont pas évolué à partir des cellules du diagnostic, mais sont issue de l'évolution d'un clone ancestral de cellules pré-leucémiques présentant un nombre restreint d'altérations génétiques.

Les différences observées entre ces études peuvent s'expliquer par le fait que les analyses réalisées dans les articles de Turati et Ebinger sont faites sur des cellules leucémiques déjà amplifiées en souris NSG. Or, il est décrit que des génotypes distincts de clones leucémiques présentent différentes capacités de reconstitution *in vivo* et que les cellules pré-leucémiques ne semblent pas amplifiées après transplantation en souris NSG (Anderson et al. 2011). Les approches de transplantations pourraient donc entraîner une perte d'hétérogénéité génétique, en appauvrissant la part de cellules pré-leucémiques.

Pour valider cette hypothèse, nous souhaitons utiliser mes expériences de rétention de signal réalisées à partir d'échantillon frais de patient au diagnostic. Nos résultats préliminaires identifient une population de cellules quiescentes au sein des cellules leucémiques du diagnostic (**Fig 6I-J** et **Fig S6H-I**). Cette observation nous amène à l'hypothèse qu'il serait possible d'utiliser la quiescence cellulaire comme marque biologique pour l'identification et la purification des pré-CSLs chez l'Homme. Ainsi, notre hypothèse est que les cellules quiescentes de la masse tumorale de patients au diagnostic présentent un nombre plus restreint d'altérations génétiques. Les cellules quiescentes et divisantes ont donc été purifiées (**Fig 6I-J** et **Fig S6H-I**). Ces échantillons vont être séquencés pour les événements primaires et secondaires afin de valider si les cellules les plus quiescentes sont enrichis en pré-CSLs. De plus, nous comptons réaliser des transplantations dans des NSG de cellules des mêmes patients CTV<sup>high</sup> et CTV<sup>low</sup>, pour étudier si la leucémogénèse se développe avec différentes cinétiques et si les cellules greffées présentent des phénotypes, génotypes et profils transcriptionnels différents.

*“Si rien n’a d’importance, alors tout en a autant”*

Iyandel

## ANNEXES

---



# PAX5-ELN oncoprotein promotes multistep B-cell acute lymphoblastic leukemia in mice

Laura Jamrog<sup>a,1</sup>, Guillaume Chemin<sup>b,1</sup>, Vincent Fregona<sup>a</sup>, Lucie Coster<sup>c</sup>, Marlène Pasquet<sup>d</sup>, Chloé Oudinet<sup>b</sup>, Nelly Rouquié<sup>a</sup>, Naïs Prade<sup>a,c</sup>, Stéphanie Lagarde<sup>a,c</sup>, Charlotte Cresson<sup>a</sup>, Sylvie Hébrard<sup>a</sup>, Ngoc Sa Nguyen Huu<sup>b</sup>, Marina Bousquet<sup>e</sup>, Cathy Quelen<sup>o</sup>, Pierre Brousset<sup>o</sup>, Stéphane J. C. Mancini<sup>f</sup>, Eric Delabesse<sup>a,c</sup>, Ahmed Amine Khamlichi<sup>b,2</sup>, Bastien Gerby<sup>a,2,3</sup>, and Cyril Broccardo<sup>a,2,3</sup>

<sup>a</sup>Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université Toulouse III Paul Sabatier (UPS), 31037 Toulouse, France; <sup>b</sup>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UPS, 31077 Toulouse, France; <sup>c</sup>Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse, 31000 Toulouse, France; <sup>d</sup>Department of Pediatric Hematology, CHU de Toulouse, 31000 Toulouse, France; <sup>e</sup>CRCT, INSERM, UPS, ERL5294 CNRS, Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer (TOUCAN), 31037 Toulouse, France; and <sup>f</sup>Aix Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes (IPC), Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), 13009 Marseille, France

Edited by Brian J. Druker, Oregon Health & Science University, Portland, OR, and approved August 29, 2018 (received for review December 14, 2017)

**PAX5** is a well-known haploinsufficient tumor suppressor gene in human B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) and is involved in various chromosomal translocations that fuse a part of PAX5 with other partners. However, the role of PAX5 fusion proteins in B-ALL initiation and transformation is ill-known. We previously reported a new recurrent t(7;9)(q11;p13) chromosomal translocation in human B-ALL that juxtaposed PAX5 to the coding sequence of elastin (*ELN*). To study the function of the resulting PAX5-ELN fusion protein in B-ALL development, we generated a knockin mouse model in which the PAX5-ELN transgene is expressed specifically in B cells. PAX5-ELN-expressing mice efficiently developed B-ALL with an incidence of 80%. Leukemic transformation was associated with recurrent secondary mutations on *Ptpn11*, *Kras*, *Pax5*, and *Jak3* genes affecting key signaling pathways required for cell proliferation. Our functional studies demonstrate that PAX5-ELN affected B-cell development in vitro and in vivo featuring an aberrant expansion of the pro-B cell compartment at the preleukemic stage. Finally, our molecular and computational approaches identified PAX5-ELN-regulated gene candidates that establish the molecular bases of the preleukemic state to drive B-ALL initiation. Hence, our study provides a new in vivo model of human B-ALL and strongly implicates PAX5 fusion proteins as potent oncoproteins in leukemia development.

B-cell acute lymphoblastic leukemia | engineered mouse models | PAX5 fusion proteins | leukemia initiation | oncogenic transformation

**B**-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common pediatric cancer. B-ALL is characterized by a blockade of B-cell differentiation combined with an uncontrolled proliferation of blastic cells. Current chemotherapy is efficient at inducing long-term remission in childhood B-ALL, but the most common cause of treatment failure remains relapse that occurs in 15 to 20% of patients (1). The prognosis is even worse in adult B-ALL, as only 30% of adults achieve long-term disease-free survival (2).

B-cell development is initiated by the entry of hematopoietic progenitors into the B-cell lineage transcription program and the concomitant sequential rearrangement of Ig genes through V(D)J recombination, ultimately leading to the generation of immunocompetent plasma cells. B-cell development can be dissected into pre-pro-B, pro-B, pre-B, immature B, and mature B-cell populations corresponding to different stages of differentiation (3). PAX5 is critical from early stages of B-cell development up to mature B cells (4). B-cell differentiation is completely blocked at the pro-B stage in *Pax5* knockout mice, revealing its importance for early B lymphogenesis (5). Indeed, PAX5 plays a critical role in B-cell lineage commitment by activating the transcription of B cell-specific genes such as *CD19* and *BLK* and suppressing alternative lineage choices (6–8).

PAX5 is the main target of genetic alterations in B-ALL. Heterozygous deletions and loss-of-function mutations of PAX5 are

found in more than one-third of human B-ALL (9–11). These alterations result in loss of PAX5 expression and impairment of DNA-binding activity and/or transcriptional activity of PAX5. PAX5 is also rearranged in 2.6% of pediatric B-ALL cases, being fused to various fusion partners (9, 12–14). PAX5 translocations have been associated with a blockade of B-cell differentiation, as illustrated by PAX5-ETV6 and PAX5-FOXP1, which fuse the PAX5 paired domain to ETV6 and FOXP1 transcription factors, respectively (15).

We previously reported the molecular characterization of a new chromosomal t(7;9)(q11;p13) translocation in two cases of adult B-ALL. This translocation juxtaposed the 5' region of PAX5 and almost the entire sequence of elastin (*ELN*) (13). The resulting PAX5-ELN fusion protein had conserved the nuclear localization sequence (NLS) and the DNA-binding paired-box domain of PAX5, and could therefore act as a constitutive repressor of the residual wild-type PAX5. Indeed, similar to PAX5-ETV6 and PAX5-FOXP1, transient expression of PAX5-ELN displayed a dominant-negative

## Significance

Engineered mouse models of acute leukemia are critical to understanding the biological mechanisms by which a primary oncogene induces disease. While PAX5 fusion proteins are considered primary oncogenic events in B-ALL, their role in leukemia development is ill-known due to the lack of animal models. This report provides a novel and accurate in vivo model for B-ALL induced by PAX5-ELN fusion protein that establishes a preleukemic phase and recapitulates the key features of human disease, including acquired mutations in genes of the JAK/STAT and RAS/MAPK pathways. This study is of general interest, as it allows a better understanding of the biological mechanism by which an oncoprotein perturbs normal B-cell development and leads to pathological B-ALL.

**Author contributions:** L.J., G.C., V.F., L.C., M.P., C.O., N.R., N.P., S.L., C.C., S.H., N.S.N.H., M.B., C.Q., P.B., S.J.C.M., E.D., A.A.K., B.G., and C.B. designed research; L.J., G.C., V.F., L.C., M.P., C.O., N.R., N.P., S.L., C.C., S.H., N.S.N.H., M.B., C.Q., B.G., and C.B. performed research; M.P. provided pediatric B-ALL samples; L.J., G.C., V.F., L.C., M.P., C.O., N.R., N.P., S.L., C.C., S.H., N.S.N.H., M.B., C.Q., S.J.C.M., E.D., A.A.K., B.G., and C.B. analyzed data; and A.A.K., B.G., and C.B. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

<sup>1</sup>L.J. and G.C. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>A.A.K., B.G., and C.B. contributed equally to this work.

<sup>3</sup>To whom correspondence may be addressed. Email: bastien.gerby@inserm.fr or cyril.broccardo@inserm.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1721678115/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1721678115/-DCSupplemental).

Published online September 26, 2018.



effect on PAX5 by down-regulating the transcription of PAX5 target genes (11, 13, 16, 17). However, the generality of the dominant-negative effect was recently questioned *in vivo* (15).

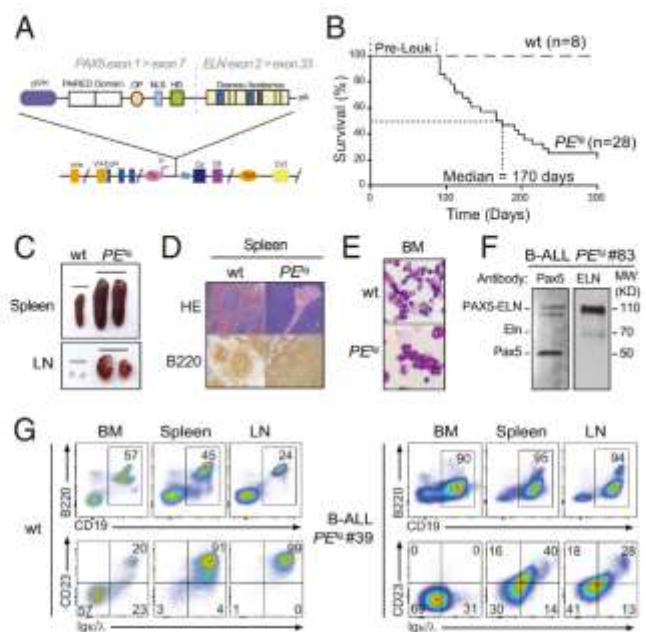
A detailed and dynamic analysis of the PAX5-ELN effect on B-ALL initiation and transformation requires the availability of a mouse model that allows a B-cell restricted expression of *PAX5-ELN*. Here, we demonstrate, by using a knockin (KI) mouse line, that PAX5-ELN is an initiating oncogenic event that perturbs normal B-cell development by aberrantly expanding pro-B cells at the earliest steps of leukemogenesis. Nonetheless, complete B-ALL transformation induced by PAX5-ELN involved the acquisition of additional mutations and the deregulated expression of multiple genes. Our study provides novel insights into the functional role of PAX5-ELN as a potent oncoprotein in B-ALL development, and should help to elucidate the molecular mechanisms that underlie B-ALL initiation and transformation.

## Results

**Constitutive Expression of Human PAX5-ELN Leads to B-ALL Development.** To investigate the B-leukemic potential of PAX5-ELN, we developed a KI mouse model in which the cDNA encoding the human PAX5-ELN fusion protein was expressed in B-cell progenitors. This was achieved by inserting the human cDNA at the *IgH* locus under the control of a VH promoter (PVH) and the endogenous E $\mu$  enhancer whose activity is triggered early in B-cell development (18). To avoid transcriptional readthrough from upstream promoters at different developmental stages, a pause/polyadenylation site (19) was added upstream of the ectopic PVH promoter (Fig. 1A and *SI Appendix*, Fig. S1). Unless otherwise indicated, the experiments have been performed on heterozygous mice.

Mutant mice that constitutively expressed PAX5-ELN (hereafter *PE*<sup>tg</sup> mice) efficiently developed leukemia with a penetrance of 80% at 300 d (Fig. 1B). Leukemic development was associated with a splenomegaly (Fig. 1C, *Upper*) characterized by a massive infiltration of B220<sup>+</sup> cells and a dramatic perturbation of the spleen architecture (Fig. 1D). Moreover, *PE*<sup>tg</sup> mice developed a lymphadenopathy (Fig. 1C, *Lower*) and exhibited blast cells in the bone marrow (BM) (Fig. 1E). Importantly, although the expression of *PAX5-ELN* was driven by *IgH* regulatory sequences, immunoblot analysis of protein extracts with a PAX5 paired domain-specific antibody revealed that the abundance of PAX5-ELN was not higher than that of endogenous PAX5 (Fig. 1F). This observation indicates that the reported effects on *PE*<sup>tg</sup> mice cannot be ascribed to high expression levels of PAX5-ELN fusion protein. Immunophenotypic characterization showed that BM, spleen, and lymph nodes (LNs) of leukemic *PE*<sup>tg</sup> mice contained an aberrant proportion of CD19<sup>+</sup> B cells associated with an aberrant and variable expression of CD23 and Ig $\kappa$ / $\lambda$  markers (Fig. 1G and *SI Appendix*, Fig. S2).

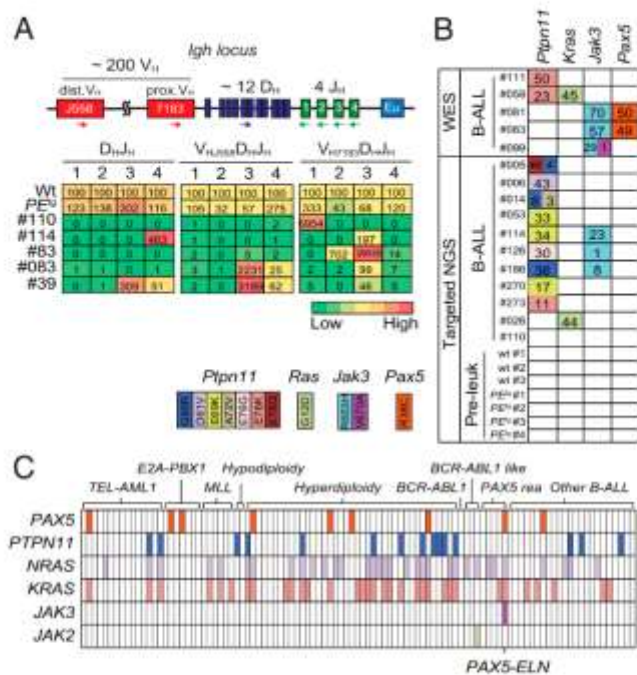
**Clonal Transformation and Collaborating Events with PAX5-ELN Oncoprotein.** The *IgH* variable region can broadly be divided into the V<sub>H</sub> domain, including the distal V<sub>HJ558</sub> and the proximal V<sub>HJ7183</sub> gene families, and the D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> domain, comprising a dozen D<sub>H</sub> segments followed by four J<sub>H</sub> segments (Fig. 2A, *Upper*) (20). Assembly of the *IgH* variable region involves two recombination steps: first D<sub>H</sub> to J<sub>H</sub>, followed by V<sub>H</sub> to D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>. To determine the rearrangement status of the *IgH* locus in leukemic cells, we performed a qPCR-based V(D)J recombination assay (21) on genomic DNA purified from blasts of five independent B-ALL mice (Fig. 2A, *Upper*). The data reveal prominent D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> and V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> rearrangements, involving both proximal and distal VH segments, in all B-ALL samples (Fig. 2A, *Lower*). These results indicate that PAX5-ELN fusion protein induces the clonal transformation of a B-cell progenitor that has already rearranged its *IgH* locus, and support the notion that PAX5-ELN acts as a potent B-ALL oncoprotein.



**Fig. 1.** Human PAX5-ELN expression induces efficient B-ALL development. (A) Generation of knockin mouse model expressing PAX5-ELN fusion protein. The sequence encoding the human PAX5-ELN fusion protein was inserted downstream of E $\mu$  enhancer. Desmos, Desmosine; HD, homeodomain; OP, octapeptide; pVH, VH gene promoter. (B) Kaplan–Meier curves of the time to leukemia for cohorts of *PE*<sup>tg</sup> mice ( $n = 28$ ). WT mice ( $n = 8$ ) were used as controls. Pre-Leuk, preleukemic time. (C–E) PAX5-ELN induces B-ALL development characterized by leukemic cell invasion in the bone marrow, spleen, and lymph nodes. (C) Pictures of spleens (*Upper*) and LNs (*Lower*) from WT and leukemic *PE*<sup>tg</sup> mice are shown. (D) Staining with hematoxylin and eosin (HE) and immunohistochemistry of B220 are shown of spleens from WT and leukemic *PE*<sup>tg</sup> mice. (E) Pictures of May–Grünwald–Giemsa-stained cytospin of BM cells from WT and leukemic *PE*<sup>tg</sup> mice. (F) Protein extract of leukemic cells from a B-ALL *PE*<sup>tg</sup> mouse (no. 83) was subjected to immunoblotting with anti-N-terminal Pax5 (N19) antibody for the detection of PAX5-ELN and endogenous Pax5 and with anti-ELN antibody for the detection of PAX5-ELN and endogenous Eln. (G) Total cells from the BM, spleen, and LNs of WT (*Left*) and leukemic *PE*<sup>tg</sup> (*Right*) mouse (no. 39) were immunophenotyped using the B220, CD19, CD23, and Ig $\kappa$ / $\lambda$  markers.

Our observations on B-ALL transformation delay (>90 d) (Fig. 1B) led us to suspect potential acquisition of secondary mutations. To further identify these additional genetic alterations that potentially cooperate with PAX5-ELN, we performed whole murine exome sequencing in five *PE*<sup>tg</sup> leukemias and identified recurrent somatic mutations in *Ptpn11*, *Kras*, *Jak3*, and *Pax5* genes. These mutations were also found after specific sequencing of these loci in an additional 11 *PE*<sup>tg</sup> leukemias (Fig. 2B). These findings strengthen the notion that aberrant activation of JAK/STAT and/or RAS/MAPK signaling pathways is required for an overt B-cell leukemia transformation in our model.

To address the critical question of the recurrence of these somatic mutations in human B-ALL, we performed the targeted sequencing of several exons of *PAX5*, *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, *JAK3*, and *JAK2* genes in a cohort of 101 pediatric B-ALL patients (Fig. 2C and *Dataset S1*). Importantly, we detected recurrent mutations in *PAX5* (9/101), *PTPN11* (15/101), *NRAS* (33/101), and *KRAS* (33/101) genes in all of the different B-ALL oncogenic subtypes (Fig. 2C). Interestingly, the patient cohort contained five PAX5-rearranged B-ALL patients, including one with the PAX5-ELN translocation that exhibited, just as in our mouse line, PAX5, NRAS, KRAS, and JAK3 mutations (Fig. 2C and *Dataset S1*). Together, the above data establish that our PAX5-ELN mouse model recapitulates the multistep pathogenesis of human B-ALL.

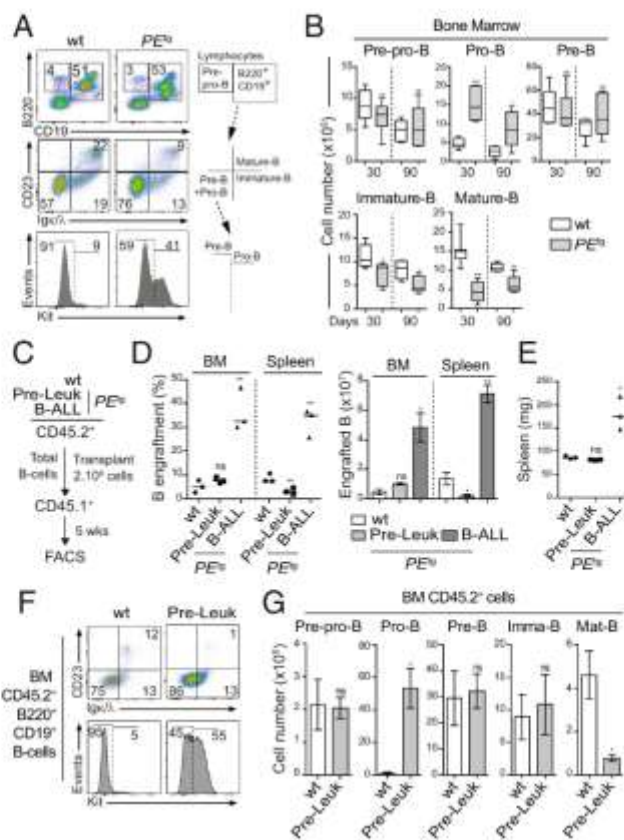


**Fig. 2.** Clonal selection in PAX5-ELN-induced B-ALL. (A) Schematic of the mouse *Igh* locus (Upper). The locus is composed of ~200  $V_H$  (red boxes), ~12  $D_H$  (blue), and 4  $J_H$  (green) segments that undergo recombination in B-cell precursors to produce a functional  $V_HD_HJ_H$  unit. Genomic DNAs were prepared from purified  $PE^{10}$  pro-B cells and five leukemic  $PE^{10}$  mice and subjected to quantitative PCR to quantify  $D_HJ_H$  and  $V_HD_HJ_H$  rearrangements using primers that bind the indicated gene segments.  $dV_H$ , distal  $V_H$ ;  $pV_H$ , proximal  $V_H$ . PCR of the H5 element downstream of the 3' regulatory region was performed for normalization of DNA input. PCR was performed in triplicate. Quantification of  $D_HJ_H$  and  $V_HD_HJ_H$  rearrangements is represented as a heat map (Lower). DNA from purified WT pro-B cells was used as a control and normalization (100% of the signal) for each gene rearrangement ranked in each column. (B) Recurrent mutations in B-ALL blasts induced by PAX5-ELN. Whole-exome sequencing (WES) was performed on BM cells from five leukemic  $PE^{10}$  mice. Mutations found on *Ptpn11*, *Kras*, *Pax5*, and *Jak3* genes were verified and screened for recurrence by targeted next-generation sequencing (NGS) on BM cells from 11 leukemic, 3 WT, and 4 preleukemic 30-d-old  $PE^{10}$  mice. Each row represents a leukemia sample, and each column represents a genetic alteration. Colors indicate the position of the mutation, and numbers represent the variant allele frequency of each mutation. (C) Mutations on *PTPN11*, *KRAS*, *NRAS*, *JAK3*, *JAK2*, and *PAX5* genes were screened for recurrence on 101 B-ALL patient samples. Each column represents a B-ALL sample classified according to the indicated oncogenic subtypes, and each row represents a genetic alteration. Colored boxes indicate the presence of a mutation, listed in Dataset S1.

**PAX5-ELN Oncoprotein Perturbs Early B-Cell Progenitor Cell Differentiation at Preleukemic Stage.** The survival curve of  $PE^{10}$  mice revealed a leukemia onset starting at 90 d after birth (Fig. 1B). This leukemia development latency allowed us to explore the effect of PAX5-ELN oncoprotein on the early steps of leukemogenesis. Cytological examination of the preleukemic  $PE^{10}$  mice confirmed the absence of blasts in the BM (SI Appendix, Fig. S3A) and any obvious perturbation of the main cell lineages (SI Appendix, Fig. S3B). Moreover, the absence of detection of *Ptpn11*, *Kras*, *Pax5*, and *Jak3* mutations in the BM of preleukemic  $PE^{10}$  mice (Fig. 2B) allowed us to precisely address the role of PAX5-ELN in leukemia initiation, before the onset of clonal transformation induced by the acquisition of additional cooperating oncogenic events.

To identify the earliest cell types that are affected by PAX5-ELN oncoprotein, we analyzed B-cell progenitors (SI Appendix, Fig. S3C) in the BM of  $PE^{10}$  mice during early and late preleukemic stages, namely at 30 and 90 d after birth, respectively.

We observed that PAX5-ELN significantly induced a three- to fourfold expansion of the pro-B population at 30 and 90 d, whereas pre-pro-B and pre-B populations were not affected (Fig. 3A and B). Interestingly, 30-d-old  $PE^{10}$  pro-B cells exhibited a polyclonal profile for  $D_HJ_H$  and  $V_HDJ_H$  gene rearrangements that was roughly comparable to their WT counterparts (Fig. 2A), indicating that PAX5-ELN-induced pro-B cell expansion was not associated with a clonal selection at the preleukemic stage. In addition, this pro-B cell expansion was associated with a reduction of the immature and circulating B-cell populations in the BM (Fig. 3A and B), indicating that PAX5-ELN partially blocked B-cell differentiation at the preleukemic stage. Accordingly, we observed a moderate but significant reduction of spleen size in preleukemic



**Fig. 3.** Pro-B cells are expanded by PAX5-ELN at a preleukemic phase. (A and B) Preleukemic  $PE^{10}$  pro-B cells exhibit an aberrant expansion potential in vivo. Immunophenotyping of BM cells from 30-d-old WT and  $PE^{10}$  mice was performed using B220, CD19, CD23, Ig $\mu$ / $\lambda$ , and Kit markers (A, Left), and a gating strategy was applied to discriminate B-cell subpopulations (A, Right and SI Appendix, Fig. S2). Absolute numbers of pre-pro-B, pro-B, pre-B, immature B, and mature B cells from the BM of 30- and 90-d-old WT and  $PE^{10}$  mice were calculated (B;  $n = 5$  to 8 mice per condition). (C–E) Preleukemic and leukemic  $PE^{10}$  B cells exhibit different engraftment potentials. Total B cells from the BM of preleukemic and B-ALL  $PE^{10}$  mice (CD45.2<sup>+</sup>) were purified and i.v. transplanted in recipient mice (CD45.1<sup>+</sup>,  $n = 3$ ,  $2.10^6$  cells per mouse) pretreated with 30 mg/kg busulfan (C). The same number of total B cells from the BM of WT mice was transplanted in parallel as control (C;  $n = 3$ ). The proportion (D, Left) and absolute numbers (D, Right) of donor-derived (CD45.2<sup>+</sup>) B cells in the recipient BM were calculated 5 wk after transplantation. Spleen weights of engrafted mice were compared (E). (F and G) Preleukemic  $PE^{10}$  pro-B cells expand after transplantation. Immunophenotyping of engrafted B cells (CD45.2<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) in the BM was performed (F), and absolute numbers of donor-derived (CD45.2<sup>+</sup>) preleukemic pre-pro-B, pre-B, pro-B, immature B, and mature B cells in the recipient BM were calculated (G). Error bars represent standard deviations, \*\*\* $P < 0.0005$ , \*\* $P < 0.005$ , and \* $P < 0.05$ ; ns, nonsignificant.

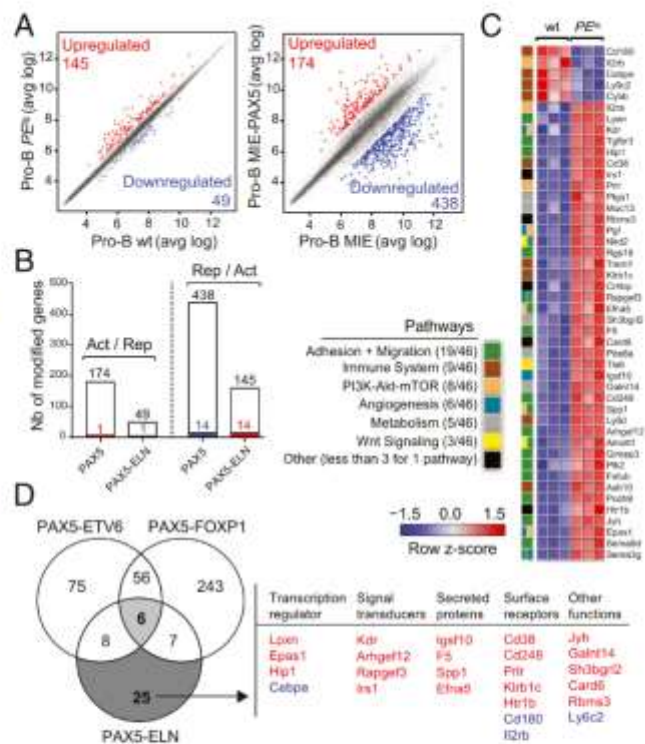
*PE<sup>tg</sup>* mice compared with age-matched WT mice (*SI Appendix, Fig. S4A*), suggesting that PAX5-ELN retained B-cell loading in peripheral lymphoid organs. Indeed, while the overall distribution of B-cell populations was unaffected by PAX5-ELN in the spleen (*SI Appendix, Fig. S4B*), the absolute number of immature and mature splenic B cells was significantly reduced in preleukemic *PE<sup>tg</sup>* mice (*SI Appendix, Fig. S4C*). The above results indicate that PAX5-ELN oncoprotein expands preleukemic pro-B cells at the expense of subsequent stages of maturation in vivo. Finally, we confirmed that PAX5-ELN altered the intrinsic capacity of differentiation of pro-B cells using in vitro functional approaches, and had a restricted expression and effect on the B-cell lineage (*SI Appendix, Text and Figs. S5 and S6*).

**PAX5-ELN Oncoprotein Confers an Aberrant Expansion Potential to Preleukemic Pro-B Cells.** We first evaluated the effect of PAX5-ELN on B-cell progenitor turnover using a total BM transplantation assay. The data strongly suggested that PAX5-ELN induced an aberrant expansion potential to preleukemic pro-B/pre-B progenitors before B-ALL transformation (*SI Appendix, Text and Fig. S7 A-D*). To strengthen this notion, we compared the reconstitution potential of WT, preleukemic, and leukemic *PE<sup>tg</sup>* B cells. Equal numbers of total B cells purified from the BM of WT, preleukemic, and leukemic *PE<sup>tg</sup>* mice were transplanted into congenic mice (Fig. 3C). Five weeks after transplantation, engraftment efficiencies of WT and preleukemic *PE<sup>tg</sup>* B cells were similarly low (Fig. 3D), and recipient mice did not exhibit splenomegaly (Fig. 3E). Interestingly, the analysis of engrafted B-cell compartments in the BM of recipient mice revealed an aberrant proportion of *PE<sup>tg</sup>* donor-derived pro-B cells specifically ( $65 \pm 15$ -fold expansion) (Fig. 3F and G and *SI Appendix, Fig. S7E*). This striking expansion was not associated with the acquisition of *Ptpn11*, *Kras*, *Pax5*, or *Jak3* mutations (*SI Appendix, Fig. S7F*). In addition, consistent with our results in steady-state conditions, we observed a moderate but significant diminution of the engraftment efficiency of preleukemic *PE<sup>tg</sup>* B cells in the spleen compared with WT controls (Fig. 3D). This was due to a reduction of the number of donor-derived immature and mature B cells (*SI Appendix, Fig. S7 G and H*).

Thus, our transplantation experiments with preleukemic B cells provide additional evidence to support that PAX5-ELN induces an aberrant self-renewal activity to normal pro-B cells before clonal and malignant transformation. On the other hand, recipient mice transplanted with clonal leukemic *PE<sup>tg</sup>* cells exhibited a high level of engraftment in the BM (Fig. 3D and E), and with the presence of *Ptpn11* mutations (*SI Appendix, Fig. S7F*), characteristic of the spreading of a clonal population.

Combined, our functional approaches establish a sharp difference in the reconstitution potential between clonal and nonclonal B-cell populations in our model. Furthermore, they indicate that the pro-B cell compartment is abnormally expanded by PAX5-ELN oncoprotein at the preleukemic stage, and therefore represents the likely cellular target of leukemia initiation.

**Gene Regulation by PAX5-ELN in Pro-B Cells.** Based on transient transfection assays, PAX5 fusion proteins including PAX5-ELN, PAX5-ETV6, and PAX5-FOXP1 were thought to act as dominant-negatives by affecting the transcriptional activity of WT PAX5 (11, 13, 16, 17). However, recent evidence in vivo revealed that PAX5-ETV6 or PAX5-FOXP1 fusion proteins marginally modified the expression of PAX5 target genes (15, 22). To address this hypothesis in our in vivo model, we first compared the gene expression profiles of purified pro-B cells from preleukemic *PE<sup>tg</sup>* mice and age-matched WT mice (*SI Appendix, Fig. S8A*). Transcriptome analysis identified 145 up-regulated and 49 down-regulated genes with an expression difference of more than 1.5-fold and an adjusted *P* value of  $<0.05$  in PAX5-ELN-expressing pro-B cells (Fig. 4A and Dataset S2). In



**Fig. 4.** (A) Scatter plot of gene expression differences between in vivo purified WT and *PE<sup>tg</sup>* preleukemic pro-B cells (Left) and between ex vivo E17.5 fetal liver *Pax5<sup>-/-</sup>* pro-B cells transduced with either MIE-PAX5 or MIE-PAX5-ELN retroviral vectors (Right) based on three independent microarray experiments. The normalized expression data of individual coding genes (indicated by dots) were plotted as the average log ratio (avg log). Up- and down-regulated genes with an expression difference of  $>1.5$ - and  $>3$ -fold, and an adjusted *P* value of  $<0.05$ , are colored in red or blue, respectively. (B) Absence of a general dominant-negative effect of PAX5-ELN on ex vivo PAX5-regulated genes in pro-B cells. Comparison of PAX5-activated and PAX5-ELN-repressed genes (Left) and of PAX5-repressed and PAX5-ELN-activated genes (Right) in preleukemic pro-B cells. Overlap indicates that one gene was activated by PAX5 and repressed by PAX5-ELN and 14 genes of the PAX5-repressed genes were activated by PAX5-ELN as represented by colored bars. (C) Heat map displaying the differential expression of PAX5-ELN-activated (red) and -repressed (blue) genes in WT ( $n = 3$ ) and *PE<sup>tg</sup>* ( $n = 3$ ) pro-B cells. The 46 PAX5-ELN-modified genes were selected on the basis of an expression difference of  $>2$ -fold ( $P < 0.05$ ) and for encoding a protein implicated in one of the indicated pathways. The expression value of each gene is visualized according to the indicated scale. The pathway annotation is shown (Left). (D) Venn diagram indicating the overlap between PAX5-ETV6-, PAX5-FOXP1-, (15), and PAX5-ELN-modified genes in preleukemic pro-B cells, selected for an expression difference of  $>3$ -, 3-, and 2-fold, respectively (Left). PAX5-ELN-modified genes that were included neither in PAX5-ETV6 nor in PAX5-FOXP1 signatures are listed according to their biological functions as transcriptional regulators, signal transducers, secreting proteins, and surface receptors. PAX5-ELN-activated and -repressed genes are indicated in red and blue, respectively.

parallel, we established a list of ex vivo PAX5-modified genes by comparing the gene expression profiles of *Pax5<sup>-/-</sup>* embryonic liver (E17.5) pro-B cells retrovirally transduced with either MIE or MIE-PAX5. This strategy led to the identification of 174 PAX5-up-regulated and 438 PAX5-repressed genes (Fig. 4A and Dataset S3). Interestingly, the gene set enrichment analysis of a well-established list of in vivo PAX5-regulated genes, arising from in vivo gene expression profiles of murine *Pax5<sup>+/+</sup>* and *Pax5<sup>-/-</sup>* pro-B cells (22), with our new ex vivo PAX5 gene signature demonstrates a global similarity between the two approaches (*SI Appendix, Fig. S8B*). We determined the overlap of

our ex vivo PAX5-activated genes with PAX5-ELN-repressed genes. This analysis revealed that only one gene was activated by PAX5 and repressed by PAX5-ELN. Conversely, only 14 of the PAX5-repressed genes were activated by PAX5-ELN in pro-B cells (Fig. 4B and Dataset S4A). Closely similar results were observed when we used the well-established list of in vivo PAX5-regulated genes (22) (SI Appendix, Fig. S8C and Dataset S4B), further validating our approach. In addition, we observed by qPCR that ectopic expression of PAX5-ELN in preleukemic pro-B cells was not associated with the down-regulation of endogenous *Pax5* and its two common target genes *CD19* and *CD79a* (SI Appendix, Fig. S8D). Finally, we confirmed that the majority of the genes modified by PAX5-ETV6 and PAX5-FOXP1 in pro-B cells (15) did not overlap with our PAX5-regulated genes (SI Appendix, Fig. S8E and F and Dataset S4C and D). Together, similar to PAX5-ETV6 and PAX5-FOXP1 (15), our results indicate that, in vivo, PAX5-ELN does not generally antagonize the normal functions of PAX5 in preleukemic pro-B cells.

To gain insight into the molecular regulation of PAX5-ELN in the early steps of B-ALL development, we focused on the genes presenting a twofold change of expression when comparing preleukemic *PE*<sup>fl</sup> with WT pro-B cells. Forty-one activated and five repressed PAX5-ELN genes were identified in preleukemic *PE*<sup>fl</sup> pro-B cells (Fig. 4C and Dataset S2). To identify shared molecular programs induced by PAX5-ETV6, PAX5-FOXP1, and PAX5-ELN, we overlapped the lists of their targets in preleukemic pro-B cells (15) (Fig. 4D). Notably, we found only six common genes, including genes encoding for a signal transducer (*Gimap3*), a secreted protein (*Sema3g*), and surface receptors (*Il2ra* and *Trem1*) (SI Appendix, Fig. S9A). In contrast, we identified 25 PAX5-ELN-modified genes, which were modified neither by PAX5-ETV6 nor by PAX5-FOXP1 (Fig. 4D). Interestingly, these genes encoded four signal transducers, four secreted proteins, and seven surface receptors but also the four transcriptional regulators *Lpxn*, *Epas1*, *Hip1*, and *Cebpe* (Fig. 4D).

The above results suggest that PAX5-ELN predominantly regulates an independent molecular program in preleukemic pro-B cells. To provide additional support to this notion, we categorized PAX5-ELN-modified genes according to pathways and identified activated (act) and repressed (rep) genes coding for proteins involved in the following processes: adhesion and migration (19 act), immune system (5 act, 4 rep), PI3K-mTOR signaling (7 act, 1 rep), angiogenesis (6 act), metabolism (5 act), and Wnt signaling (3 act) (Fig. 4C). Most of these pathways are strongly deregulated in PAX5-ETV6-induced B-ALL cells compared with their preleukemic counterparts (15), suggesting that PAX5-ELN activates at the preleukemic stage a molecular program required for B-ALL development in PAX5-ETV6<sup>fl</sup> mice. Interestingly, we identified six genes (*Epas1*, *Arhgef12*, *Fetub*, *Rapgef3*, *Galnt14*, and *Cd248*) activated by PAX5-ELN in preleukemic pro-B cells that were shown to be specifically activated in B-ALL PAX5-ETV6 cells (SI Appendix, Fig. S9B).

In conclusion, we have identified regulated PAX5-ELN genes in preleukemic pro-B cells with important functions in several signaling pathways and gene candidates that establish the molecular bases to drive B-ALL development.

## Discussion

Genome-wide profiling identified the *PAX5* gene as the most frequent target of somatic mutation in human B-ALL (11). Nonetheless, while *PAX5* acts as a main tumor suppressor gene in B-ALL, B-cell development is normal in heterozygous *Pax5*<sup>+/-</sup> mice (5, 23), unless primed by chemical or retroviral mutagenesis (24), suggesting oncogenic cooperation for B-ALL transformation. Indeed, the tumor suppressor functions of *Pax5* in B leukemogenesis were revealed under constitutive activation of STAT5, JAK1, and JAK3 (24, 25). *PAX5* is also involved in reciprocal translocations leading to the fusion of its N-terminal

domain with the C-terminal sequence of a second transcription factor such as ETV6 and FOXP1 (11, 26). In contrast with heterozygous *PAX5* deletions, which are considered to have a secondary role during late stages of leukemogenesis, it is generally assumed that *PAX5* fusion proteins act as primary oncogenic events altering normal B-cell development in the early steps of the disease (14). A wide diversity of fusion partners has been described (9, 14). Remarkably, they all conserve the N-terminal DNA-binding region of *PAX5* and the NLS but lack the potent C-terminal transcriptional regulatory domains, suggesting that the *PAX5* part of the chimeric protein is required for leukemogenesis.

The loss of *PAX5* transcriptional domains in the chimeric proteins led to the notion that the fusion proteins might act as constitutive repressors, as shown in various reporter assays (11, 13, 16, 27). Consequently, it was inferred that B-ALL might arise as a result of an antagonizing effect of the fusion proteins on *PAX5* activity. The situation may be more complex, as illustrated by the recent finding that PAX5-ETV6 and PAX5-FOXP1 do not actually modify the expression of *PAX5* target genes but rather implicate pre-B cell receptor, migration, and adhesion signaling pathways (15). PAX5-ELN rearrangement is unusual because it does not involve a transcription factor but an extracellular matrix protein (13). Furthermore, PAX5-ELN is one of the chimeric proteins that conserves the largest part of *PAX5*. Although PAX5-ELN blocked the transcription of *PAX5* target genes in transactivation assays (13), our results indicate that PAX5-ELN was able to repress only one of the *PAX5*-activated genes and to activate a small subset of the *PAX5*-repressed genes, strongly suggesting that PAX5-ELN does not generally antagonize the normal function of *PAX5* in preleukemic pro-B cells. Thus, in line with PAX5-ETV6 and PAX5-FOXP1 models (15), our in vivo data do not support the generality of a dominant-negative mechanism for *PAX5* fusion proteins.

Several hypotheses could be put forward to account for this discrepancy. One possible explanation could be merely quantitative. In heterozygous mice, thus mimicking the situation in patients, the concentration of the fusion protein may be below the threshold required to exert a dominant-negative effect, whereas this threshold may be readily achieved in transient reporter assays. As mentioned above, expression of a small subset of *PAX5*-regulated genes was impacted by PAX5-ELN, suggesting that there are instances in vivo where the dominant-negative effect is exerted by the oncoprotein. Alternatively, though not mutually exclusively, fusion proteins may be subjected to different regulatory mechanisms (half-life, posttranslational modifications, interacting partners, etc.) in vivo from the time lapse of transient expression. In this context, it should be noted that although the expression of *PAX5-ELN* cDNA was driven by the powerful *IgH* regulatory elements, *PAX5-ELN* levels were not higher than endogenous *PAX5* levels, excluding an inappropriate ectopic expression of the fusion protein in our model. Importantly, although the insertion of *Pax5* into the *IgH* locus led to T lymphomas (28), the weak expression of *PAX5-ELN* in thymocytes did not perturb T-cell development, underlying the restricted effect of *PAX5-ELN* expression on the B-cell lineage.

Interestingly, while PAX5-ETV6 and PAX5-FOXP1 arrested lymphopoiesis at the pro-B/pre-B cell transition, they did not induce leukemia on their own in the corresponding mutant mice (15), suggesting the requirement of cooperating mutations for B-ALL transformation. Specifically, in contrast to the PAX5-ETV6 mouse model that required oncogenic cooperation (i.e., loss of the *Cdkn2a/b* tumor suppressor locus) for leukemia development (15), PAX5-ELN efficiently induced B-ALL in mice. In this context, most deregulated pathways in preleukemic PAX5-ELN pro-B cells were also strongly deregulated in PAX5-ETV6-induced B-ALL cells. Further analysis revealed that PAX5-ELN predominantly regulated an independent molecular

program in preleukemic pro-B cells, in which activation of six genes, also found activated in B-ALL PAX5-ETV6 cells (15), may explain the stronger potential of PAX5-ELN to induce B-ALL compared with PAX5-ETV6.

B cell-specific, constitutive expression of PAX5-ELN led to clonal transformation associated with the acquisition of additional mutations in key components of the JAK/STAT and RAS/MAPK pathways. These pathways represent two common targets of somatic mutations in other oncogene-induced B-ALL mice (29, 30) and in human B-ALL (11), including PAX5-ELN B-ALL cases (31, 32). Our analysis of a B-ALL patient cohort revealed the presence of *PAX5*, *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, and *JAK3* mutations within different B-ALL oncogenic subtypes including PAX5-rearranged leukemias and a PAX5-ELN B-ALL case.

This study clearly demonstrated the effect of PAX5-ELN on leukemia initiation at the preleukemic stage, before malignant transformation. The partial blockade of differentiation induced by PAX5-ELN was associated with an aberrant expansion of pro-B cells, which was also revealed by transplantation assays. Importantly, this proliferative advantage was not associated with an obvious clonal selection and therefore suggests that PAX5-ELN confers self-renewal properties to pro-B cells, a situation that is reminiscent of the E2A-PBX1 mouse model (30). This observation supports the view that aberrant self-renewal activity of lymphoid progenitors induced by a primary oncogene can be an initiating event in leukemia development. This establishes a preleukemic stage setting genetic instability and accumulated genetic alterations that cooperate to lead to fully transformed B-ALL (33). Emerging evidence suggests that primary genetic alteration can convert normal committed progenitors into preleukemic stem cells by reprogramming aberrant self-renewal

properties both in lymphoid and myeloid lineages (33–35). Importantly, recent findings proposed that long-lasting preleukemic stem cells were hidden within the bulk of leukemic cells, and served as a reservoir for disease relapse (36, 37). An important challenge is to identify and target these leukemic initiating cells that represent an extremely rare subpopulation in patients. In this respect, the availability of the PAX5-ELN mouse model should be valuable. Additionally, by recapitulating the different steps of the human disease, the model represents a major opportunity to develop new therapeutic strategies on both B-ALL initiation and transformation, and a robust and reproducible tool for preclinical studies of drug screening and development.

## Experimental Procedures

Generation of the PAX5-ELN knockin mouse model, FACS analysis, Ig rearrangement assay, whole-exome sequencing and specific resequencing, transplantation assay, microarray experiment, retroviral transduction, co-culture of pro-B cells, RT-PCR, Western blot, and statistical analysis are described in *SI Appendix*.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We acknowledge the cytometry and cell-sorting facility of the CRCT (INSERM U1037) and the IPBS animal facility for technical assistance. We are grateful to Manon Farcé and Laetitia Ligat from the facilities of the CRCT for assistance with flow cytometry and microscopy, respectively. We thank the Anexplo/Genotoul platforms for technical assistance (UMS006 and histology department). This research was supported by Institut National du Cancer (INCa) R111908B-INCA 2011-131-PAX5, ARC Grant SFI20101201888, and FEDER Grant CITIL. G.C., N.R., C.C., and N.S.N.H. were supported by INCa Grant R111908B-INCA 2011-131-PAX5. The team is supported by association Laurette FUGAIN, Ligue nationale contre le cancer, "111 des arts," Association Capucine, Société Française des Cancers de l'Enfant, and la région Occitanie. Work in the A.A.K. lab is supported by INCa, ANR, and Fondation ARC.

- Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arcenci RJ (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: An update. *J Clin Oncol* 29:551–565.
- Armstrong SA, Look AT (2005) Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23:6306–6315.
- Hardy RR, et al. (2000) B-cell commitment, development and selection. *Immunity Rev* 175:23–32.
- Adams B, et al. (1992) Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev* 6:1589–1607.
- Urbánek P, Wang ZQ, Fetka I, Wagner EF, Busslinger M (1994) Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* 79:901–912.
- Souabni A, Coboleda C, Schebesta M, Busslinger M (2002) Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17:781–793.
- Nera KP, et al. (2006) Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* 24:283–293.
- Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M (2015) Pillars article: Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*. 1999. 401: 556–562. *J Immunol* 195:766–772.
- Nebral K, et al. (2009) Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 23:134–143.
- Familiades J, et al. (2009) PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: A GRAALL study. *Leukemia* 23:1989–1998.
- Mullighan CG, et al. (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446:758–764.
- Medvedovic J, Ebert A, Tagoh H, Busslinger M (2011) Pax5: A master regulator of B cell development and leukemogenesis. *Adv Immunol* 111:179–206.
- Bousquet M, et al. (2007) A novel PAX5-ELN fusion protein identified in B-cell acute lymphoblastic leukemia acts as a dominant negative on wild-type PAX5. *Blood* 109:3417–3423.
- Coyaud E, et al. (2010) Wide diversity of PAX5 alterations in B-ALL: A Groupe Francophone de Cyto-génétique Hematologique study. *Blood* 115:3089–3097.
- Smeenk L, et al. (2017) Molecular role of the PAX5-ETV6 oncoprotein in promoting B-cell acute lymphoblastic leukemia. *EMBO J* 36:718–735.
- Kurahashi S, et al. (2011) PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML. *Oncogene* 30:1822–1830.
- Kawamata N, Pennella MA, Woo JL, Berk AJ, Koeffler HP (2012) Dominant-negative mechanism of leukemogenic PAX5 fusions. *Oncogene* 31:966–977.
- Kemp DJ, Harris AW, Cory S, Adams JM (1980) Expression of the immunoglobulin C mu gene in mouse T and B lymphoid and myeloid cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2876–2880.
- Haddad D, et al. (2011) Sense transcription through the 5' region is essential for immunoglobulin class switch recombination. *EMBO J* 30:1608–1620.
- Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW (2006) Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 24:541–570.
- Brakia FZ, Chemin G, Moutahir M, Khamilchi AA (2014) Quantification of V(D)J recombination by real-time quantitative PCR. *Immunity Lett* 162:119–123.
- Revilla-I-Domingo R, et al. (2012) The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcriptional programmes in early and late B lymphopoiesis. *EMBO J* 31:3130–3146.
- Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401:556–562.
- Dang J, et al. (2015) PAX5 is a tumor suppressor in mouse mutagenesis models of acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 125:3609–3617.
- Heltemes-Harris LM, et al. (2011) Ebf1 or Pax5 haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 208:1135–1149.
- Cazzaniga G, et al. (2001) The paired box domain gene PAX5 is fused to ETV6/TEL in an acute lymphoblastic leukemia case. *Cancer Res* 61:4666–4670.
- Fazio G, et al. (2013) PAX5/ETV6 alters the gene expression profile of precursor B cells with opposite dominant effect on endogenous PAX5. *Leukemia* 27:992–995.
- Souabni A, Jochum W, Busslinger M (2007) Oncogenic role of Pax5 in the T-lymphoid lineage upon ectopic expression from the immunoglobulin heavy-chain locus. *Blood* 109:281–289.
- van der Weyden L, et al. (2015) Somatic drivers of B-ALL in a model of ETV6-RUNX1: Pax5(+/-) leukemia. *BMC Cancer* 15:585.
- Duque-Afonso J, et al. (2015) Comparative genomics reveals multistep pathogenesis of E2A-PBX1 acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 125:3667–3680.
- Mullighan CG, et al. (2009) JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:9414–9418.
- Denk D, Bradtke J, König M, Strehl S (2014) PAX5 fusion genes in t(7;9)(q11.2;p13) leukemia: A case report and review of the literature. *Mol Cytogenet* 7:13.
- Hong D, et al. (2008) Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* 319:336–339.
- Gerby B, et al. (2014) SCL, LMO1 and Notch1 reprogram thymocytes into self-renewing cells. *PLoS Genet* 10:e1004768.
- Krivtsov AV, et al. (2006) Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442:818–822.
- Shlush LI, et al.; HALT Pan-Leukemia Gene Panel Consortium (2014) Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 506:328–333, and erratum (2014) 508:420.
- Mullighan CG, et al. (2008) Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 322:1377–1380.

Review

# Oncogene-Induced Reprogramming in Acute Lymphoblastic Leukemia: Towards Targeted Therapy of Leukemia-Initiating Cells

Vincent Fregona <sup>†</sup>, Manon Bayet <sup>†</sup> and Bastien Gerby <sup>\*†</sup> 

Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR-1037, Université Toulouse III Paul Sabatier (UPS), 31100 Toulouse, France; vincent.fregona@inserm.fr (V.F.); manon.bayet@inserm.fr (M.B.)

\* Correspondence: bastien.gerby@inserm.fr

† These authors contributed equally to this work.

**Simple Summary:** Acute lymphoblastic leukemia is a heterogeneous disease characterized by a diversity of genetic alterations, following a sophisticated and controversial organization. In this review, we present and discuss the concepts exploring the cellular, molecular and functional heterogeneity of leukemic cells. We also review the emerging evidence indicating that cell plasticity and oncogene-induced reprogramming should be considered at the biological and clinical levels as critical mechanisms for identifying and targeting leukemia-initiating cells.

**Abstract:** Our understanding of the hierarchical structure of acute leukemia has yet to be fully translated into therapeutic approaches. Indeed, chemotherapy still has to take into account the possibility that leukemia-initiating cells may have a distinct chemosensitivity profile compared to the bulk of the tumor, and therefore are spared by the current treatment, causing the relapse of the disease. Therefore, the identification of the cell-of-origin of leukemia remains a longstanding question and an exciting challenge in cancer research of the last few decades. With a particular focus on acute lymphoblastic leukemia, we present in this review the previous and current concepts exploring the phenotypic, genetic and functional heterogeneity in patients. We also discuss the benefits of using engineered mouse models to explore the early steps of leukemia development and to identify the biological mechanisms driving the emergence of leukemia-initiating cells. Finally, we describe the major prospects for the discovery of new therapeutic strategies that specifically target their aberrant stem cell-like functions.

**Keywords:** oncogene-induced reprogramming; (pre-)leukemic stem cells; cell plasticity; self-renewal; oncogenic transcription factors; acute lymphoblastic leukemia



**Citation:** Fregona, V.; Bayet, M.; Gerby, B. Oncogene-Induced Reprogramming in Acute Lymphoblastic Leukemia: Towards Targeted Therapy of Leukemia-Initiating Cells. *Cancers* **2021**, *13*, 5511. <https://doi.org/10.3390/cancers13215511>

Academic Editor: David Wong

Received: 7 October 2021

Accepted: 28 October 2021

Published: 2 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cell plasticity is a property required for cell reprogramming. The specification of cellular fate during development and differentiation is a dynamic and evolving process that initiates in stem/progenitor cells. A network of transcription factors controls the balance between the maintenance of stem cell identity and the process of lineage specification. However, somatic cell identity is not fixed and can be modified since cellular reprogramming has been achieved. Especially, the concept of the stability of stem cell function has been challenged by the finding that only the Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4 transcription factors are required for the reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPS) [1]. Interestingly, these four factors have been shown to be oncogenic in different contexts [2], suggesting a link between cell reprogramming and tumorigenesis. This observation is along the lines of the notion that cancer progression is characterized by the gradual loss of a differentiated state associated with the reprogramming of stem cell-like features.

Indeed, transcriptional and epigenetic modifications occurring in malignant cells frequently lead to tumor dedifferentiation and the acquisition of stemness features [3] and can be exploited using machine learning approaches to predict the clinical outcome and to identify potential drugs targeting the stemness signature [4]. Thus, cell plasticity, oncogene-induced reprogramming, self-renewal, perturbation of lineage identity and cancer initiation appear to be tightly intertwined and should be considered as critical mechanisms for identifying and targeting the cell-of-origin of cancer.

Self-renewal is defined by the functional property of stem cell populations that undergo symmetric or asymmetric divisions to preserve tissue integrity and homeostasis in normal development. In adult hematopoiesis, sustained self-renewal is a distinctive function of normal hematopoietic stem cells (HSCs) which is tightly controlled by a network of transcription factors [5], whereas committed hematopoietic progenitors are devoid of this stem cell property. Thus, it was originally thought in myeloid malignancies that the biological features of leukemic stem cells (LSCs) come from reminiscent states of normal HSCs in which self-renewal is a central property in the process of leukemia initiation. In particular, pioneering studies in chronic myeloid leukemia (CML) considered that the primary oncogenic event takes place in rare and self-renewing multipotent stem cells [6,7], and established the concept that these cells are prone to transformation because of their unique self-renewal capacity. In acute myeloid leukemia (AML), the notion that leukemia originates from an HSC or a committed progenitor is debated in the field. The phenotypic characterization of LSCs in the original studies led to the idea that AML is organized in a hierarchical pattern, in a way similar to that of normal hematopoiesis and derive from the malignant transformation of a primitive hematopoietic cell [8,9]. Supporting this notion, some murine leukemia models have led to show that AML-initiating mutations occur at the level of HSCs and alter their self-renewal properties [10,11]. However, there is evidence that leukemia-initiating activity can be observed not only in an immature cell population but also in populations corresponding to a range of normal committed progenitors. Indeed, a number of studies brought evidence that more mature progenitors, that normally lack any potential for self-renewal, may be the cells-of-origin in AML [12–16]. Thus, oncogenic transcription factors can destabilize the normal molecular program of target cells, leading to changes in gene expression and to a total or partial loss of the original cell identity.

Defined as the most frequent pediatric cancer, acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a multistep disease characterized by the acquisition of diverse genetic alterations that can be classified into more than 20 B-lineage subtypes (B-ALL) and more than 10 T-lineage subtypes (T-ALL). These different oncogenic subgroups are established according to the identity of the first oncogenic event carrying in the leukemic cells [17]. Chemotherapy is efficient at inducing long-term remission in child but is associated with severe side effects and undesirable consequences, including second malignant neoplasms. Indeed, while the 5-year survival rates now exceed 90%, the most common cause of treatment failure in pediatric ALL remains relapse that occurs in approximately 15–20% of patients [17]. In addition, the treatment is also limited by indiscriminate toxicity towards normal HSCs. Over the last decade, genome-wide analyses, mainly through next generation sequencing approaches, have been extensively used to draw the genomic landscape and the gene expression profile of ALL patients. As recently reviewed and updated both in T-ALL [18] and B-ALL [19,20], this offered major insights regarding the diversity of oncogenic subtypes associated with altered signaling pathways and led to patient stratification and to the discovery of new therapeutic opportunities. However, although current chemotherapy is efficient at reducing the tumor load by targeting proliferating and metabolically active leukemic cells, the disease relapse points to the presence of resistant cells that escape treatment [21]. Thus, pioneering works and emerging studies converge around the notion that the biological properties of pre-leukemic and/or leukemic stem cells, including oncogene-induced reprogramming, cell plasticity, sustained self-renewal activity, cell-quiescence and drug-resistance, can significantly affect leukemia treatment and should be considered in the search for new and more targeted therapies.

With a focus on B-ALL and T-ALL, we present in this review previous and current studies exploring the cellular, molecular and functional heterogeneity in leukemic cells from patients. With a particular emphasis on the lymphoid lineage, we also review the engineered mouse models that led to the recognition that a single primary oncogene could be sufficient to confer stem cell-like properties to committed progenitors, converting them to a population of pre-LSCs. Finally, we describe the perspectives for the identification of new therapeutic agents that specifically target their aberrant stem cell-like functions.

## 2. Cellular and Molecular Heterogeneity in Acute Leukemia: In Search of Leukemic Stem Cells

### 2.1. *The Origin of the Leukemic Stem Cell Concept*

According to several pioneering works [22–27], normal hematopoiesis is a well-known tightly regulated process based on a hierarchical organization in which a small number of multipotent stem cells maintain all of the hematopoietic lineages. Similar to the normal hematopoietic system, the concept of leukemic stem cells (LSCs) supports the idea that leukemic cells are functionally heterogeneous, following a hierarchical model in which only a minor population of LSCs residing are able to initiate and indefinitely maintain the neoplastic tissue. Historically and experimentally built on xenograft transplantations, this concept has come from pioneering studies on AML from Dick's laboratory, which have defined a distinct subpopulation of tumor cells characterized by their capacity to initiate and propagate the disease when transplanted into immunodeficient mice [8,9]. Since this finding, xenotransplantation of human leukemic cells has become the gold standard assay to study LSC activity [28]. Based on an immunophenotypic identification, AML was thus the first hematological malignancy with a reported LSC population within the tumor bulk that sustains the long-term leukemia development. This has been confirmed by a number of subsequent studies describing a rare and specialized population of LSCs enriched in the CD34+CD38-Lineage- fraction from AML patients [29–32]. However, transplantable LSCs from AML samples could also be found in the CD34+CD38+ and CD34- subpopulations, albeit with lower frequency [28,33–35], and therefore could be phenotypically more diverse than originally thought. Despite this controversy, it is still inferred that in contrast to leukemic blasts that have limited self-renewal potentials, LSC-enriched populations reside at the apex of the leukemia hierarchy, are able to sustain long-term tumor growth and constitute an important driver of relapse through their slow division rate that make them resistant to conventional therapies [28,36].

### 2.2. *Phenotypic and Functional Plasticity in ALL*

The notion of cellular and functional heterogeneity in leukemic cells is of fundamental interest to understand the leukemia initiation and development in patients. Therefore, the hierarchical model of the LSC concept was applied to acute lymphoblastic leukemia, in both B-ALL and T-ALL. In B-ALL, scientists extensively used CD34, CD38 and CD19 markers to explore cellular and functional heterogeneity in leukemic blasts from adult and infant patients, which lead to many controversies [37]. It has originally been proposed that leukemic cells with the HSC-like immunophenotype CD34+CD19- exclusively contained LSCs in both high and standard risk B-ALL [38,39]. However, the following investigations demonstrated that self-renewal activity can be enriched in leukemic subpopulations expressing the CD19 marker [40–43], corresponding phenotypically to a range of normal B-cell precursors. Nevertheless, the prospective enrichment of LSCs in B-ALL using the CD34 and CD38 surface markers, associated or not with CD19, led to highly variable results [37,42–44]. These controversial conclusions could be explained by the possibility that the majority of blasts among the tumor can sustain leukemia-initiating activity, thus following a stochastic model of B-ALL. Indeed, Vormoor and colleagues challenged the hierarchical stem cell concept by demonstrating using limiting dilution assays (LDAs) that B-ALL cells able to engraft immunodeficient mice are highly frequent and are not restricted to a population with a specific immunophenotype [43,45]. Using



an *in vivo* tracking approach by cellular barcoding of B-ALL samples combined with deep sequencing, the same group reported that leukemia-initiating clones are abundant and functionally equipotent, exhibiting a similar ability to reconstitute the disease over serial transplantations [46]. Other investigations by Rieger and colleagues demonstrated at the single-cell level that the expression of CD34 and CD38 markers is a highly plastic and dynamic process at the surface of B-ALL blasts [47], which also could explain the previous discrepancies in using these two markers for the enrichment of LSC activity. In the same line of thought, the loss of CD19 antigen expression at the surface of leukemic cells enabling the tumor to evade chimeric antigen receptor (CAR) immunotherapy [48,49] is a well-known representative example of antigen plasticity and evolved adaptation of leukemic cells upon the treatment. Therefore, the identification of several stable surface markers aberrantly expressed in leukemic cells is critical to follow the disease evolution and to monitor resistant cells [50,51]. Together, phenotypic and functional plasticity should be considered in experimental approaches to identify LSC-enriched populations, but also at the clinical level to explain therapy escape mechanisms and B-ALL relapse.

In contrast to B-ALL, there are few published studies of cell populations enriched in LSCs from human T-ALL samples. Nevertheless, original works demonstrated that leukemia-initiating activity can be explored by using *in vivo* xenografts and *in vitro* assays [52,53]. The functional heterogeneity in human T-ALL combined with the phenotypic characterization of the LSC compartment has been explored using CD34, CD7 and CD4 surface markers. In particular, the work from Pflumio's group reported that CD34+CD7-CD4- fraction from the blood of T-ALL patients does not produce leukemic blasts but undergoes normal hematopoiesis *in vitro* and after transplantation into immune-deficient mice [54], which is quite similar to what has been observed for the CD34+CD19-CD38- population from B-ALL patients [41,42], and that correspond to the residual and circulating normal hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs). In fact, LSC activity seems to be exclusively present in the CD7+ fraction [54,55], suggesting that T-ALL initiation is triggered in a committed T-cell. Finally, T-ALL development is significantly pronounced after the xenograft of CD7+CD34+ leukemic cell population, as demonstrated in three independent studies [54,56,57]. Interestingly, despite the fact that the CD34 marker seems to be useful to enrich LSC activity from T-ALL samples, immunophenotyping of donor-derived blasts in xenograft samples revealed that CD34+ blasts may lose the CD34 marker after transplantation, and vice versa [57]. This observation suggests that CD34 could be a plastic marker at the surface of T-ALL blasts, as it has been shown at the clonal level in B-ALL [47], and asks about the functional relevance and the correspondence of LSC surface markers between blasts from patients and blasts from patient-derived xenografts (PDX).

Collectively, these studies challenge the hierarchical organization of the stem cell concept in ALL by raising the question of whether surface marker plasticity is connected to functional plasticity within the tumor. Indeed, T-ALL characteristics such as cell-surface immunophenotype, but also dormancy and chemoresistance, are under the influence of the bone marrow (BM) niches, indicating an important cellular and functional plasticity of leukemic cells in response to their *in vivo* microenvironment [58]. Using ALL xenograft models combined with *in vivo* cell-division assay, Jeremias and colleagues also addressed this notion by demonstrating that stem cell properties, such as dormancy, treatment-resistance and leukemia-initiating activity, are reversible [59]. In addition, the authors showed that the functional plasticity of dormant clones is dependent of their *in vivo* environment and suggest that this reversible mechanism could be involved in treatment failure and ALL relapse. The molecular characterization of those dormant and chemo-resistant clones recently led to the extraction of a core subset of genes that would help for the risk stratification of ALL patients [60], as previously achieved in AML [61]. Together, these findings raise the importance of considering cellular and functional plasticity in the clinical outcome of ALL patients. This points to the need to focus on the functional mechanisms of leukemic cells, such as self-renewal, cell-quiescence and -resistance, to identify new specific LSC markers.

### 2.3. When Molecular Diversity and Clonal Evolution Meet the LSC Theory

Accurately addressing the cell-of-origin in leukemic patients using surface markers seems to be obviously limited, not only by the plastic properties of leukemic blasts as previously described, but also by their genetic heterogeneity, which represents a major hallmark of cancers, including ALL [62,63]. Indeed, the development of acute leukemia is a multistep process characterized by the acquisition of accumulated mutations. Consistent with the observation that acute leukemias exhibit a limited number of genetic alterations [64], each mutation can perturb critical cellular functions and their combinatorial interaction would be sufficient to cause leukemia.

Through a cytogenetic approach by multiplex fluorescence in situ hybridization (M-FISH), Greaves and colleagues explored in a ground-breaking study the intraclonal genetic architecture of leukemic cells from B-ALL patients. Since the M-FISH approach allows for the detection of up to eight genetic alterations at the single-cell level, the authors provided the first direct evidence for genetic diversity of leukemic cells by establishing phylogenetic trees of clonal evolution within individual patients [65]. Major insights in the composition and the dynamic of subclones in leukemic cells have been also gained through the comparison of the genetic landscape of paired diagnostic and relapse ALL samples, as performed in numerous works [66–75]. Thus, genome-wide studies, including single nucleotide polymorphism (SNP), next generation sequencing (NGS), comparative genomic hybridization (CGH) and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analyses of matched diagnosis-relapse ALL samples, led to an exhaustive characterization of the genetic profile of patients during the evolution of their disease. These integrative approaches helped to establish the complex architecture of individual leukemia and revealed that a relapse may be generated from major, minor or ancestral clones from the initial diagnosis. Remarkably, Mullighan and colleagues demonstrated that more than half of the relapse ALL samples lacked some of the genomic copy number abnormalities (CNAs) present at the diagnosis and acquired new and distinct genetic lesions [66,75,76]. This observation indicated that in the majority of ALL cases, relapse leukemic cells have evolved not from the bulk of the diagnosis cells but from a clone that harbored a restricted number of genetic alterations, such as a founding chromosomal translocation. Indeed, while a relapse may be produced from a predominant clone at the diagnosis, the majority of them arise from pre-existing minor subclones highly diluted within the diagnosis sample or from the clonal evolution of an ancestral clone [66,75,77,78].

By the same way of evidence, whole- and targeted-exome sequencing of peripheral blood cells from a large cohort of healthy individuals identified that 10 to 20% of people aged over 70 harbor pre-leukemic mutations resulting in the dominance of a small number of HSC-derived clones, a process called age-related clonal hematopoiesis (ARCH) [79,80]. While these pre-leukemic HSCs still have the capacity to differentiate and produce healthy blood cells, additional mutations can lead to disease progression towards myeloid malignancies such as AML [81]. In addition, ultra-sensitive deep sequencing of targeted genomic regions from AML patients revealed the existence of long-lasting clones carrying pre-neoplastic mutations, referred to as pre-leukemic HSCs hidden within the bulk of the tumor and that serve as a reservoir for disease progression [82–84]. These cells can thus acquire stem cell-like drug resistance mechanisms and by way of consequences, are spared by current treatment and are involved in the disease evolution and relapse. Despite of their low abundance in patients, it has been recently shown using clonal tracking from single-cell transcriptomics that these pre-LSCs exhibit a specific gene expression profile, distinct from that of leukemic cells and of normal HSCs [85].

Since xenotransplantation remains the gold standard assay to evaluate leukemia-initiating activity, the notion that genetic subclones are frequently selected in xenograft models adds a level of complexity to the LSC definition. Nevertheless, tracking leukemic clones in immunodeficient mice not only provides insights into the genetic and clonal architecture of human ALL, but also can be used to isolate resistant and adaptive subclones that participate to disease progression. Indeed, it has been shown that xenograft models

of T-ALL can recapitulate at the genetic and functional levels to the gain of malignancy observed at relapse of the disease, including aggressiveness and therapy resistance [86]. Consistent with a branched rather than linear evolution, oncogenic trees showed that xenograft and relapse samples had frequently derived from an ancestral pre-leukemic clone, and not from diagnosis cells. Interestingly, in the case of *ETV6-RUNX1*-induced B-ALL, the putative ancestral pre-leukemic clone harboring the *ETV6-RUNX1* fusion only observed at the time of diagnosis does not regenerate neither over serial transplantations nor at the relapse [65]. This finding suggests that although xenografting leukemic cells allow us to explore the genetic progression and the aggressiveness of the disease, it does not represent a relevant approach to expand and isolate ancestral pre-leukemic clones. The branching and multi-clonal evolution model of leukemogenesis has been similarly explored using xenotransplantation approaches in *BCR-ABL1* [87] and in *MLL*-rearranged [88] ALL. Therefore, although debated in the literature [89,90], genetic and clonal variegations should definitely be considered to define LSCs by using transplantation in immunodeficient mice. Through an unprecedented large-scale LDA xenografting approach combined with targeted sequencing, this point was recently clarified by the isolation and the characterization of subclones from diagnosis B-ALL samples responsible for a relapse [91]. These clones, referred to as diagnosis Relapse-Initiating (dRI) clones, can be revealed only in a minor proportion of xenografted mice and display low sensitivity to chemotherapeutic agents. At the molecular level, dRI clones activate the mitochondria metabolism and unfolded protein response (UPR) [91], two stress molecular pathways that have been described to be critical in the maintenance of stem cell homeostasis and function [92,93].

A better understanding about the dynamic and the selection of leukemic cells during disease progression has also been gained through single-cell developmental classification methods. In particular, Nolan and colleagues developed a single-cell mass cytometry (CyTOF) approach [94] allowing for the simultaneous quantification of up to 35 proteins, including surface markers and intracellular phosphorylated proteins involved in normal and pathological B-cell development [95,96]. Using this strategy, they were able to align human B-cell subpopulations into a unified trajectory and to precise their regulatory signaling pathways during early differentiation checkpoints [96]. Built on this expertise and combined to machine learning approaches, they recently established a single-cell classification of human B-ALL at the diagnosis and identified specific features, such as activated mTOR signaling and unresponsive pre-BCR signaling, which were sufficient to predict patient relapse [95]. In addition, Müschen and colleagues recently used single-cell amplicon sequencing combined with a single-cell phosphoprotein analysis to study the interaction of oncogenic lesions in STAT5 and ERK signaling pathways during normal B-cell development and malignant transformation [97]. Using these approaches, the authors showed that the driver mutations in these two pathways are mutually exclusive in human B-ALL, consistent with the segregation of STAT5 and ERK phosphorylation. Moreover, the following functional experiments showed that concurrent oncogenic STAT5 and ERK activation can subvert leukemia development, demonstrating the proof of concept that the reactivation of divergent and conflicting signaling pathways represents a powerful barrier to transformation [97]. Recently, single-cell amplicon sequencing has also been applied in human T-ALL to study their clonal heterogeneity and evolution [98]. Strikingly, this approach allowed for the detection of clinically relevant subclones at diagnosis that evolved to major clones at later disease stages.

Collectively, these studies uncovered a considerable and interconnected subclonal diversity in leukemic cells from ALL patients, resulting from a complex, nonlinear and branching evolutionary pathway. They have also demonstrated that the majority of ALL relapses after chemotherapy arise from persisting and resistant minor clones already existing at the time of diagnosis, which can be revealed using xenograft models. These studies predicted the existence of an ancestral pre-diagnostic clone harboring a minimal set of genetic alterations which is not yet transformed but at the top of the tumoral hierarchy and heterogeneity. In addition to genomic approaches, this set of publications also highlights

the relevance in using single-cell phosphoprotein analyses to define a precise trajectory of normal and pathological B-cell development and to anticipate the relapse of the disease.

### 3. Oncogene-Induced Reprogramming in ALL: Tracking (Pre-)Leukemic Stem Cells

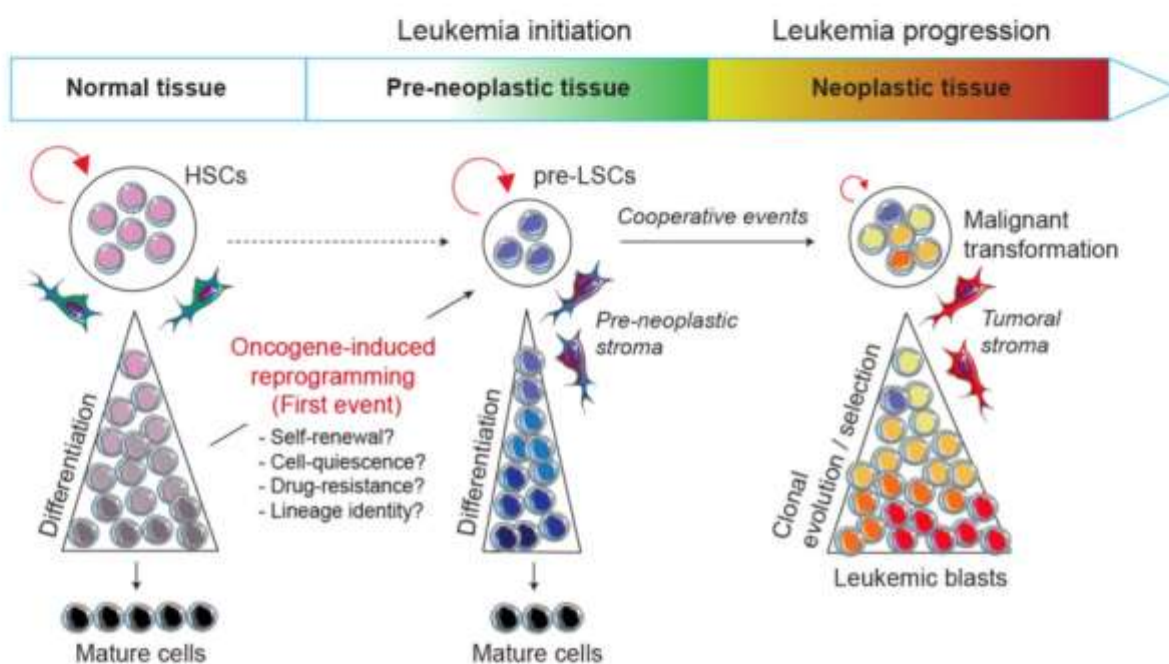
#### 3.1. Self-Renewal Property and Lineage Plasticity: Early Events of Leukemogenesis?

Major insights about the multistep process and the prenatal origin of ALL development have been gained from 25 years of outstanding studies by Greaves and his group, exploring leukemia initiation and progression in monozygotic twins [99]. These studies revealed that chromosomal translocations, in particular *ETV6-RUNX1*, could be detected in blood cells many years before the leukemia onset, establishing a pre-leukemic sub-clonal compartment. Thus, these pre-leukemic cells contain the founding genetic alteration but do not have the capacity to induce the disease by themselves. Later in life, the acquisition of full complement mutations transforms them into malignant leukemic cells, subject to clonal evolution and selection processes, and leads to the genetic heterogeneity of the tumor bulk at the time of diagnosis [99]. Therefore, it seems to be clear that *ETV6-RUNX1* originates prenatally during fetal hematopoiesis and acts as a first oncogenic event in a committed B-cell to induce the emergence of a pre-leukemic clone with altered self-renewal and survival properties [100]. Interestingly, the self-renewing pre-leukemic clone exhibits the combination of surface markers CD34+CD38-CD19+CD10- that corresponds neither to a normal B-cell subpopulation nor to fully transformed leukemic blasts. Together, these findings support the view that self-renewal is an early and obligatory event in leukemia initiation, a specific feature of the cell-of-origin, and differs from the propagating activity of fully transformed leukemic blasts. Obviously, the major limit is that pre-leukemic clones are very infrequent in ALL patients [65,75]. Therefore, except in rare cases of paired leukemic and pre-leukemic monozygotic twins [99], exploring their biological properties remains highly challenging.

To tackle this issue, the development of engineered mouse models in which there are activated particular oncogenes in specific lineages is of critical interest. Indeed, transgenic mice represent a valuable tool to understand the biological mechanisms by which a primary oncogene induces the disease and their use opens new challenges and has several perspectives: (i) it allows us to decipher biological mechanisms by which an oncogenic pathway perturbs normal hematopoietic development and reprograms a committed progenitor into a pre-LSC during the disease initiation; (ii) it helps to understand the multistep process of the disease from the pre-leukemic to the leukemic stages by identifying the oncogenic collaborative events driving malignant transformation; (iii) it allows us to explore at the molecular and functional levels the crosstalk between pre-leukemic and leukemic cells with their microenvironment; and (iv) finally, it aims to develop therapies that specifically target markers and/or biological mechanisms involved in leukemia development and resistance (Figure 1).

The use of AML mouse models corroborated that the genetic alterations of transcription factors are early events in leukemia development and can interfere with essential cellular functions of somatic cells. As examples, oncogenes such as *MOZ-TIF2* [12], *MLL-AF9* [13], *MLL-ENL* [14] or *PML-RAR* [15,16] were shown to be able to induce AML development when introduced into committed target cells. Precisely, the molecular and cellular characterization of the cell-of-origin from the AML mouse models led to the recognition that these cells can self-renew and exhibit a self-renewal gene signature induced by such oncogenic transcription factors. For example, *AML1-ETO* and *MLL-AF9* disrupt the normal hematopoietic functions by inducing self-renewal activity of myeloid progenitors prior the progression towards overt leukemia [13,101,102]. In the case of *MLL-AF9*, gene expression arrays have revealed that the oncogene can activate an HSC-like program in committed granulocyte-macrophage progenitors [13,102]. However, other oncogenes such as *BCR-ABLp190* are unable to confer self-renewal properties to hematopoietic progenitor cells [12]. In these cases, the self-renewal function must be conferred by the targeted cell or by additional genetic alterations. On the other hand, the abrogation of transcription factor

activity could also result in impaired differentiation and the development of hematopoietic malignancies, such as myelodysplastic syndrome (MDS) and AML. For example, the loss of function mutations of the two important transcription factors RUNX1 and CEBP $\alpha$  have been identified in rare familial hematopoietic disorders involving a predisposition to MDS and AML. Furthermore, murine models with diminished expression of key transcription factors such as JunB, Gata1 and Gata2 have shown to perturb HSC regulation and function, establishing a pre-leukemic state, primed to undergo subsequent AML transformation [103–105]. These observations support the view that the loss of function of key transcription factors can also lead to the emergence of an aberrant pre-leukemic stem cell population prior to clonal transformation.



**Figure 1.** Model of leukemic evolution. A first oncogenic event can either convert a normal HSC or reprogram a normal committed progenitor into a self-renewing pre-LSC. Thus, pre-LSCs are the first cells carrying the initial pre-leukemic lesion but are still able to differentiate and give rise to mature cells. Next, following secondary and cooperative events transform pre-LSCs into malignant leukemic cells that are subjected to clonal evolution and selection processes.

Considering the importance of self-renewal in leukemia initiation, an outstanding question remains how one oncogenic transcription factor can modify or reprogram stem cell-like properties in normal cells and can lead to the emergence of a pre-neoplastic population (Figure 1). The occurrence of biphenotypic leukemias and the concept of lineage infidelity in acute leukemias have long been thought of as a degree of plasticity in leukemic cells which either is conferred by the cell-of-origin, such as a pluripotent stem/progenitor, or results from the oncogene subversion of the process of lineage determination in a committed progenitor [106]. This long-lasting idea revives the question of to what extent oncogenic transcription factors in acute leukemias lead to the reactivation of self-renewal genes with or without pluripotency. It also asks to what extent oncogenic alterations that arise in committed progenitors lead to a whole or partial reprogramming of a normal cellular fate and open a new pathologic developmental program. Moreover, the exploration of the cell-of-origin in mixed phenotype acute leukemia (MPAL) led to the idea that a founding alteration, rather than the secondary events, primes pre-leukemic clones for lineage plasticity [107].

### 3.2. Pre-Leukemic Thymocyte Self-Renewal: Lesson from bHLH Transcription Factors

In ALL, the demonstration that an oncogenic transcription factor can reprogram a committed progenitor into an aberrant self-renewing pre-LSC has been made for the first time in thymocytes. Since bone marrow-derived progenitors settle in the thymus and gradually lose stemness properties and acquire T-cell characteristics, normal thymocytes have a very limited self-renewal capability [108]. Indeed, thymic output requires continuous seeding from HSCs-derived progenitors, and thymic progenitors progress into the thymus through several stages of differentiation (DN1-4, ISP8, DP) before giving rise to CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> immunocompetent cells [109,110]. Therefore, the thymus represents a relevant cellular platform to study oncogene-induced reprogramming. As assessed by serial transplantation of pre-leukemic thymocytes, McCormack and colleagues reported that the overexpression of the *Lmo2* oncogene in the thymus induces the emergence of a population of pre-LSCs [111]. Precisely, using Cd2-*Lmo2* transgenic mouse model that recapitulate the human T-ALL, the study showed that enforced expression of *Lmo2* converts normal DN3 thymocytes into a self-renewing, pre-leukemic population by reprogramming a stem cell-like gene program.

LMO proteins, members of the LIM-domain only family, lack the DNA-binding ability and require a protein interaction with basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors such as SCL/TAL1 (SCL) or LYL1 to form a multiprotein complex on DNA and activate the transcription that controls HSPC functions [112]. Based on this molecular evidence, protein-protein interaction should occur between bHLH and LMO1/2 oncoproteins to activate the aberrant stem cell gene program in pre-LSCs. Indeed, Hoang and colleagues showed that the ectopic expression, the interaction and the collaboration of SCL and LMO1 oncoproteins are critical to alter thymocyte differentiation [113] and to induce a self-renewal molecular network for the emergence of pre-LSCs in the thymus [114,115]. Therefore, the capacity of SCL-LMO1 to reprogram DN3 thymocytes into self-renewing pre-LSCs mirrors in some aspect the physiological function of SCL, which controls the repopulation ability and the maintenance of HSPCs [116–118]. Furthermore, associated with LMO1, LYL1 ectopic expression mimics the effect of SCL to activate the self-renewal function in pre-LSCs [114], corroborating their functional redundancy described in normal HSCs [119]. In contrast, the loss of function approaches showed that *Lyl1*, but not *Scl*, is required for *Lmo2*-induced thymocyte self-renewal [120]. This observation suggests that *Lmo2* oncoprotein interacts preferentially with endogenous *Lyl1* than with *Scl* for thymocyte reprogramming. According to the importance of *Scl* gene dosage in normal HSPCs [117,118], the alternative explanation would be that the physiological levels of *Scl* in thymocyte progenitors are not sufficient for its efficient interaction with *Lmo2* oncoprotein.

Cell purification indicates that only DN3 thymocytes in both *Lmo2* or *SCL-LMO1* mouse models are able to colonize the thymus of recipient mice in transplantation assays [111,114]. The intriguing question then is what predisposes DN3 subsets to reprogramming by these primary oncogenes? The DN3 stage represents a critical restriction point in the thymus when thymocytes are committed to the T-lineage and lose non-T potential under the influence of NOTCH and pre-TCR signaling pathways. Reprogramming self-renewal activity likely occurs just prior to pre-TCR signaling since self-renewal can be induced in *Cd3ε*<sup>-/-</sup> DN3a cells [114]. Thus, while pre-TCR signaling represents a collaborating event in T-ALL progression and transformation [121], it is dispensable for the initial transition from DN3 thymocytes to pre-LSCs. Therefore, NOTCH signaling, which is activated at highest levels in DN3 cells [122], represents a strong candidate to collaborate with *Lmo2* or *SCL-LMO1* oncogenes in thymocyte reprogramming. NOTCH signaling is essential for T-cell commitment and specification [123] but its role in stem cell self-renewal is controversial. Indeed, some studies indicate that NOTCH does not exert an essential function in adult HSCs [124–126], while others suggest that NOTCH activation enhances their self-renewal capacity [127,128]. The frequent occurrence of activating mutations of the *NOTCH1* gene in T-ALL patients [129] and in mouse models of the disease [110,130], as well as the sensitivity of both human [52,56] and murine leukemic blasts [131] to NOTCH1

inhibitors, strongly indicates that a gain of function of NOTCH1 represents a critical step in cell transformation. Nonetheless, enforced expression of NOTCH signaling by itself does not convert thymocyte progenitors into pre-LSCs [111,114], comforting the notion that *NOTCH1* mutations observed in patients are collaborating and not initiating events in the leukemogenesis process. However, pre-LSC self-renewal induced by *SCL-LMO1* collaborates with the physiological levels of the NOTCH-MYC signaling axis [114], which is provided by the cellular interactions with thymic stromal cells. Thus, in contrast to leukemia propagating cells which have acquired different sets of secondary mutations, pre-LSCs are believed to be genetically and phenotypically stable, are still capable of differentiating into mature and functional T-cells and remain highly dependent on their thymic microenvironment [111,114,121].

The major advantage of the transgenic models is to provide unrestricted and reproducible access to pre-LSCs that allow us to study and target their cellular and molecular mechanisms and particularly those involved in therapy resistance. Recent works showed that pre-LSCs are resistant to chemotherapeutic agents because of their distinctive slow-division rate [132,133]. Indeed, it is well known that cell quiescence may be an important limitation for therapeutic efficiency, as exemplified at the clinical level in CML [134,135]. Using doxycycline-inducible *H2B-GFP<sup>hi</sup>* mice, a gold standard in vivo model to study cell quiescence of normal HSCs [136,137], Curtis and colleagues demonstrated that self-renewal, drug resistance and clonal evolution are restricted to a rare and slow-cycling population of pre-LSCs in the *Lmo2*-induced T-ALL model [133]. This work not only defines for the first time the importance of the cell cycle restriction in pre-LSC activities, but also makes the *H2B-GFP* system as a powerful in vivo tool to purify slow-cycling pre-LSCs in other models and to develop strategies targeting the quiescence and the resistance of relapse-inducing clones.

Collectively, this set of publications provided new insights into the long-lasting questions concerning the cell-of-origin of T-ALL and the molecular mechanisms by which oncogenic transcription factors can reprogram the self-renewal property to thymocytes, thus establishing a pre-leukemic state before malignant transformation. These studies demonstrate that the main effect of the transcription factor SCL, associated with its partner LMO1/2, is to induce DN3 thymocyte self-renewal. While thymocyte reprogramming induced by other T-ALL transcription factors such as TLX1, TLX3 or HOXA remains unexplored, emerging studies indicate that chromosomal rearrangements generating NUP98 fusion proteins can induce thymocyte self-renewal prior the DN3 stage [138,139]. These observations suggest that only particular cells possess the necessary molecular background to allow for oncogene reprogramming, and conversely, only some oncogenes, in the right cellular context, can induce stem cell-like properties. Despite this, the question of whether a primary oncogene in ALL induces sufficient molecular and functional plasticity to cause lineage subversion remains poorly explored. Interestingly, SCL and LMO2 belong to the five transcription factors that convert adult fibroblasts to multipotent hematopoietic progenitors [140], suggesting their critical functions in cellular and molecular reprogramming of committed cells. Using the generation of targeted mouse lines conditionally expressing *Lmo2*, two recent studies demonstrate that *Lmo2* acts as a “hit-and-run” oncogene in T-ALL development [141,142]. Precisely, while pre-LSC self-renewal activity required continuous *Lmo2* expression, overt leukemia frequently evolves in a *Lmo2*-independent manner [142]. This observation strongly suggests that oncogenic evolution occurring in fully transformed blasts overcomes the requirement of the initiating event. In addition, B-cell-restricted expression of *Lmo2* reprograms committed B-cells into malignant T-ALL [141], demonstrating the proof of concept that a primary oncogene can induce sufficient reprogramming to switch from a B-cell fate to a T-cell neoplastic process. The cell-of-origin and the role of the primary oncogene *ETV6-RUNX1* in lineage organization have also been addressed recently [143]. Using a lineage-specific oncogenic activation approach, Vicente-Duenas and colleagues demonstrated that *ETV6-RUNX1* can give rise to both B-ALL and T-ALL and that leukemia transformation is dependent from the nature of the acquired secondary

mutations [143]. Although *ETV6-RUNX1* is always associated with B-ALL in humans, this strategy predicts that pre-leukemic clones exhibit a T-cell potential. Together, these findings have important implications to develop targeted therapies of pre-LSCs.

### 3.3. Cell Reprogramming by PAX5 Mutants: To B-Cells or Not to B-Cells?

Adult B-cell development is initiated in the BM by the entry of hematopoietic progenitors into the B-cell lineage transcription program and the concomitant sequential rearrangements of the immunoglobulin genes through V(D)J recombination, leading to the generation of immune-competent plasma cells. B-cell development can be dissected into pre-pro-B, pro-B, pre-B, immature B and mature-B cell populations corresponding to different stages of differentiation [144]. B-lineage commitment is characterized by the rearrangement of the immunoglobulin heavy-chain (*IgH*) locus that occurs during the differentiation of pre-pro-B cells to pro-B cells. Productive  $V_H-D_H-J_H$  recombination leads to the expression of the  $Ig\mu$  protein as part of the pre-B cell receptor (pre-BCR), which promotes the transition from the pro-B to the pre-B cell stage [145]. Then, successful immunoglobulin light-chain (*IgL*) gene rearrangement in pre-B cells results in the emergence of immature  $IgM^+$  B cells that emigrate from the BM to peripheral lymphoid organs [146]. B-cell lineage is generated from HSCs by a complex and tightly regulated differentiation processes. Among them, the *PAX5* gene encodes the crucial transcription factor PAX5, which has been described as the guardian of B-cell identity [147,148]. Indeed, while the developmental progression from early B progenitors to plasma cells is regulated by several extracellular signals and transcription factors [149], PAX5 is considered as a master piece to control the irreversible commitment of lymphoid progenitors to the B-cell lineage by activating the transcription of B-cell-specific programs and by suppressing alternative lineage choices [147,150,151]. The initial work demonstrated that B-cell differentiation is completely blocked at the transition between pre-pro-B and pro-B stages in *Pax5*<sup>-/-</sup> mice, revealing the critical role of Pax5 in the B-cell commitment [152]. Then, functional experiments, including transplantation assays, revealed that *Pax5*<sup>-/-</sup> B-cells had the ability to home in on the BM, where they exhibited aberrant engraftment activity [153]. In addition, uncommitted *Pax5*<sup>-/-</sup> B-cells are able to differentiate into several hematopoietic cell types, either in vitro in the presence of appropriate cytokines or in vivo after transplantation [147,153–155]. Finally, Pax5 inactivation in mature B-cells leads to the downregulation of B-cell-specific genes and the reactivation of lineage-inappropriate genes [156–158]. This process allowed for their conversion into functional T cells exhibiting *IgH* and *IgL* gene rearrangements by dedifferentiation back to early uncommitted progenitors [159]. Interestingly, the loss of lineage identity by the elimination of Pax5 in mature B-cells is also associated with an increased risk of lymphoma development [159]. Together, these findings highlight the critical role of Pax5 in B-lineage commitment and in maintaining the B-cell identity. Given the importance of normal Pax5 in the B-cell development and the degree of plasticity of committed B-cells, the question of whether and to what extent genetic alterations involving *PAX5* could reprogram B-cell progenitors and perturb their identity and function remain to be fully explored.

*PAX5* is a well-known haploinsufficient tumor suppressor gene in human B-ALL. Indeed, heterozygous deletions of *PAX5* are found in about one-third of patients [160–162]. These alterations, which are considered as secondary events in B-ALL development, result in the reduction of *PAX5* expression or impairment of DNA-binding activity and/or transcriptional activity of *PAX5*. However, *Pax5* heterozygous mice exhibit normal B-cell development and is not sufficient to induce leukemia in the absence of other oncogenic lesions [163]. The tumor suppressor role of Pax5 has been revealed in these mice using chemical-induced mutagenesis approaches [164]. In addition, the Pax5 tumor-suppressor activity has been demonstrated through the modulation of other critical transcription factors, such as *Ebf1* [165,166], *Ikzf1* [167] and *Stat5* [168]. Since genetic lesions of *PAX5*, *EBF1* and *IKZF1* are commonly found in human B-ALL, it suggests that the dosage of these three genes is critical to prevent the disease [169,170]. Interestingly, combined



heterozygous deletion of *Pax5* and *Ebfl* partially blocks the differentiation of pro-B cells and increases their lineage plasticity before the leukemia onset [165,166,171]. Indeed, *Pax5*<sup>+/-</sup>*Ebfl*<sup>+/-</sup> pro-B cells downregulated critical genes for the preservation and the stability of the B-cell identity, revealing their response to NOTCH signaling and their T-cell potential in vitro and in vivo. Although the authors did not detect any sign of dedifferentiation into classical hematopoietic progenitors, they demonstrated in this study that simultaneous reduction of *Pax5* and *Ebfl* induces at the molecular and functional levels a process of lineage conversion in pre-leukemic pro-B cells [171]. Interestingly, molecular reprogramming has been also observed in *Ikzf1* [172] deficient mouse models before the leukemia onset. Thus, these studies reinforce the notion that reprogramming, a partial loss of B-cell identity and leukemia initiation are critical mechanisms involved in pre-leukemic cells prior to malignant transformation. Interestingly, recent works from Sanchez-Garcia and colleagues demonstrated that leukemia initiation and progression can be triggered upon natural infection exposure [173,174] or by altering the gut microbiome [175] in *Pax5* heterozygous mice as well as in the *Sca1-ETV6-RUNX1* model. Indeed, the production of inflammatory cytokines triggered by infection can promote leukemia growth in *Pax5*<sup>+/-</sup> mice [176]. These studies strongly support the epidemiological evidence suggesting that patterns of infection and inflammation after birth have a causal role in triggering the acquisition of full complement mutations in pre-neoplastic cells to transform them into malignant leukemia [99]. Indeed, emerging evidence demonstrates that a major driver for the conversion from a pre-leukemic clone to fully transformed B-ALL is the exposure to immune stressors, which currently represent a major therapeutic opportunity in the field [177].

PAX5 is also rearranged in 2.6% of pediatric B-ALL cases, being fused to a wide diversity of fusion partners involving other transcription factors such as ETV6 and FOXP1, chromatin regulators such as NCoR1 and BRD1, a protein kinase such as JAK2 and an estrogen-related receptor such as ESRRB [160,178–181]. All PAX5 fusion proteins conserve the N-terminal DNA-binding paired domain of PAX5 and lack the C-terminal domain, including the transactivation domain [160,180]. Chromosomal translocations involving PAX5 have been associated with a blockage of B-cell differentiation, the first reported and frequent example being PAX5-ETV6, which fuses the PAX5 paired domain to almost the entire ETV6 transcription factor [182]. In contrast to PAX5 deletions, PAX5 translocations act as primary oncogenic events, altering normal B-cell development in the early steps of the disease. Therefore, PAX5 fusion proteins represent strong candidates to reprogram stem cell features in B-cell progenitors. However, studying their role in leukemia development is highly limited by the lack of animal models. Exhaustively, transgenic mice expressing PAX5-ETV6 and PAX5-FOXP1 fusion proteins from the *Pax5* locus have been generated. While they failed to induce B-ALL on their own, both fusion proteins blocked the B-cell development at the pro-B/pre-B cell transition [183]. Recently, our group developed a new genetically engineered mouse model of B-ALL induced by PAX5-ELN [184], a fusion protein previously identified in patients [179]. Driven by the *IgH* locus, PAX5-ELN efficiently induced the B-ALL in mice associated with the acquisition of secondary mutations in genes involved in the JAK/STAT and RAS/MAPK pathways, which are recurrently found in B-ALL patients [162] and in other oncogene-induced B-ALL models such as ETV6-RUNX1 [185] and TCF3-PBX1 [186] transgenic mice. Thus, these transgenic mice accurately reproduce the key features of leukemia development and provide a valuable in vivo model mimicking the multistep process of human B-ALL. Importantly, the leukemia development is preceded by three months of a pre-leukemic phase which is also associated with a partial blockade of differentiation at the transition of pro-B/pre-B stages. Thus, our in vivo model opens the way for deciphering the biological mechanisms by which a PAX5 fusion protein reprograms normal B-cell progenitors, perturbs B-cell identity and leads to the emergence of pre-LSCs. In addition, it should help us to explore the molecular and the functional crosstalk between pre-LSCs and their BM niches.

Point mutations of *PAX5* are found in about 7% of both adult and childhood B-ALL [161,162]. Somatic mutations of *PAX5* are a hallmark of B-ALL [161,162] and inherited *PAX5* mutations have also been reported [187,188]. In contrast to *PAX5* translocations that lead to the loss of trans-activating/inhibitory domains and conserves the integrity of the DNA-binding domain, *PAX5* point mutations are predicted to result in lost or altered DNA-binding or transcriptional regulatory functions [162,189]. The somatic mutation *P80R* of *PAX5* (*PAX5-P80R*) was recurrently identified within the exon 3 encoding the paired DNA-binding domain and represents the most frequent *PAX5* point mutation [161,162]. Recently, it has been shown that the *PAX5-P80R* mutation induces a unique transcriptional program in patients, defining an independent B-ALL subtype and supporting the notion that *PAX5-P80R* is an initiating lesion in the process of leukemogenesis [190–193]. However, the question of whether *PAX5* mutations and *PAX5* fusion proteins exhibit different molecular mechanisms in driving B-ALL remains unanswered. Therefore, comparing the effect of *PAX5* fusion proteins and *PAX5* mutations on B-cell reprogramming and B-cell identity should bring novel insight on the general biological mechanisms required for normal and pathological B-cell development.

#### 4. Murine Models as Tools to Explore the Multistep Process of ALL

As documented in the previous sections, murine models represent valuable tools to explore oncogene-induced reprogramming that occurs in the early step of leukemia development. Furthermore, their use has greatly contributed to understanding the natural history of the human disease from the pre-leukemic state to the following fully transformed stages. Here, we review and update the mouse models that have been developed for mimicking the multistep process of leukemia development both in T-ALL and B-ALL. Thus, we summarize the mouse strains that have been used to study the impact of the inappropriate expression of an oncogenic transcription factor on pre-leukemic T- or B-cell lineages, and to identify their associated collaborative events driving malignant transformation (Table 1).

**Table 1.** T-ALL and B-ALL mouse models exploring the biological mechanisms by which an oncogenic transcription factor perturbs normal hematopoietic development during the pre-leukemic phase and leads to malignant transformation.

Transgene	Additional Modifications	Pre-Leukemic State/ Reprogramming	Disease Evolution/ Collab. Events	Ref.
T-ALL mouse models				
bHLH transcription factors and partners				
Scl ( <i>pSil</i> , <i>Cd2</i> or <i>Sca1</i> promoters)	-	Perturb T-cell differentiation	No leukemia	[194–196]
Scl ( <i>Lck</i> promoter)	-	Perturb T-cell differentiation	T-ALL (low penetrance)	[131,197–199]
Lmo2 ( <i>Lck</i> promoter)	-	Perturb T-cell differentiation	T-ALL (low penetrance)	
Scl-Lmo2 ( <i>Lck</i> promoters)	-	Expansion of DN3/DN4 populations	T-ALL (~3 months) <i>Notch1</i> mutations	
	-	Pre-leukemic DN3 thymocyte self-renewal (pre-LSCs) ETP-ALL-like molecular signature	T-ALL (~10 months) <i>NOTCH1</i> and <i>Dnm2</i> mutations	[111,133,200]
Lmo2 ( <i>Cd2</i> promoter)	Scl <sup>Δ/-</sup> or Lyl1 <sup>-/-</sup>	Lyl1, but not Scl, required for pre-LSC self-renewal	Lyl1 is required for T-ALL development	[120]
	Hhex <sup>Δ/-</sup> or Kit <sup>Wv/Wv</sup>	Hhex regulates Kit to promote radioresistance and pre-LSC self-renewal	Hhex and Kit are not required for T-ALL development	[201]
	Dnm2 <sup>V235G</sup>	Restore cycling and survival of pre-LSCs	Accelerate T-ALL progression	[200]
	H2B-GFP (Tet-on system)	Identification of chemo-resistant and cell cycle-restricted pre-LSCs	Cell cycle restriction is critical for clonal evolution	[133]
	H2B-GFP Cdkn1a <sup>-/-</sup>	Loss of asymmetric cell division and cell cycle restriction	Reduce T-ALL progression	
Lmo2 ( <i>Tet-off</i> system)	-	Lmo2 expression required for pre-LSC self-renewal	Lmo2-independent T-ALL development (~12 months) <i>Ikzf1</i> deletions	[142]
Lmo2 ( <i>Cre</i> -driving <i>Rosa26</i> promoter)	-	Lmo2 reprograms committed B-cells into malignant T-ALL	Lmo2: “hit-and-run” oncogene in T-ALL	[141]

Table 1. Cont.

Transgene	Additional Modifications	Pre-Leukemic State/ Reprogramming	Disease Evolution/ Collab. Events	Ref.
SCL-LMO1 ( <i>pSil</i> and <i>Lck</i> promoters, respectively)	-	Impaired T-cell differentiation Pre-leukemic DN3a thymocyte self-renewal (pre-LSCs) Activation of a stem cell gene signature Pre-LSCs low proliferation rate and chemosensitivity	T-ALL (~4 months) <i>NOTCH1</i> mutations	[113,114,121,132]
	NOTCH1 ( <i>Lck</i> promoter)	Enhance pre-LSC self-renewal Expand the pool of pre-LSC to DN1-4 and ISP8 populations	Accelerate T-ALL progression (~1 month)	[114,121]
	Cd3ε <sup>-/-</sup> and NOTCH1 Cd3ε <sup>-/-</sup>	Pre-TCR dispensable for pre-LSC self-renewal	Pre-TCR required for T-ALL development	
LYL1-LMO1 ( <i>Lck</i> promoters)	-	Pre-leukemic DN3 thymocyte self-renewal	ND	[114]
Fusion proteins				
NUP98-HOXD13 ( <i>Vav</i> promoter)	-	Pre-leukemic DN2 thymocyte self-renewal (pre-LSCs) Overexpression of HOXA cluster genes	MDS/AML (mostly)/T-ALL (~15%)	[138,202]
	<i>Lyl1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Lyl1</i> required for pre-LSC self-renewal	T-ALL (100%)	
B-ALL mouse models				
Pax5 dosage				
<i>Pax5</i> <sup>-/-</sup>	-	Blockade at pre-pro-B stage (B220 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> Kit <sup>+</sup> ) Self-renewal activity, multilineage potential	No leukemia	[147,153]
<i>Pax5</i> <sup>Δ/-</sup> ( <i>Cre</i> -mediated deletion)	-	Lineage plasticity and dedifferentiation of mature B-cells Conversion of B-cells into BCR-rearranged functional T-cells	B-cell lymphoma	[159]

Table 1. Cont.

Transgene	Additional Modifications	Pre-Leukemic State/ Reprogramming	Disease Evolution/ Collab. Events	Ref.
	-	No differentiation blockade	No leukemia	[163,203]
Pax5 <sup>+/-</sup>	Chemical (ENU) or retroviral (MMLV) mutagenesis	-	B-ALL (~6 to 8 months) <i>Pax5</i> and <i>Ikzf1</i> deletions, <i>Jak1</i> and <i>Jak3</i> mutations	[164]
	Infection exposure or microbiome disturbance	-	B-ALL (~6 to 16 months) <i>JAK3</i> , <i>Stat5b</i> and <i>Pax5</i> mutations	[173–175]
	Ebf1 <sup>+/-</sup>	Partial blockage at pro-B stage Reveal oncogenic potential of Il7-Myc axis Lineage plasticity of pro-B cells (T-lineage conversion)	B-ALL (~7 months) <i>Jak1</i> , <i>Stat5b</i> , <i>Cblb</i> and <i>Myb</i> mutations	[165,166,171]
	Ebf1 <sup>+/-</sup> Ikzf1 <sup>+/-</sup>	-	B-ALL (40%) T-ALL (35%)	[204]
	CA-Stat5b	-	B-ALL (~2 months)	[168]
Pax5 mutations				
Pax5 P80R	- Pax5 <sup>P80R/+</sup>	-	B-ALL (~5 months)	[190]
	-Pax5 <sup>P80R/P80R</sup>	-	B-ALL (~3 months) <i>Jak1</i> and <i>Jak3</i> mutations	
PAX5 Y351*	-Pax5 <sup>Y351*/+</sup>	-	B-ALL (~25 months)	[205]
	-Pax5 <sup>Y351*/Y351*</sup>	-	B-ALL (~8 months) <i>Jak3</i> and <i>Ptpn11</i> mutations	
Pax5 rearrangements				
PAX5-ETV6 ( <i>Pax5</i> promoter)	-	Blockade between pro-B/pre-B cells	B-ALL (<10%)	[183]
	Cdkn2ab <sup>+/-</sup>	-	B-ALL (~6 months)	
PAX5-ELN ( <i>IgH</i> enhancer)	-	Partial blockage at pro-B stage Aberrant expansion potential of pre-leukemic pro-B	B-ALL (~6 months) <i>Ptpn11</i> , <i>Kras</i> , <i>Jak3</i> and <i>Pax5</i> mutations	[184]

Table 1. Cont.

Transgene	Additional Modifications	Pre-Leukemic State/ Reprogramming	Disease Evolution/ Collab. Events	Ref.
Other rearrangements				
ETV6-RUNX1 ( <i>Etv6</i> promoter)	- Sleeping beauty (SB) transposon system	-	No leukemia B-ALL (~6 months) Jak1 and Jak3 mutations	[185]
ETV6-RUNX1 ( <i>Sca1</i> promoter)	- Infection exposure or microbiome disturbance	- Perturb B-cell development	No leukemia B-ALL (~11%)	[175,206]
ETV6-RUNX1 ( <i>Cre</i> -driving <i>Etv6</i> promoter)	-	Pre-leukemic <i>ETV6-RUNX1</i> HSPC ( <i>Sca1</i> - <i>Cre</i> /Infectious stimuli) Propensity to trigger T and B malignancies	B-ALL ( <i>Pax5</i> mutations) T-ALL ( <i>NOTCH1</i> and <i>Bcl11b</i> mutations)	[143]
TCF3-PBX1 ( <i>TCR Vβ</i> and <i>Lck</i> promoters <i>Igμ</i> enhancer)	- CD3ε <sup>-/-</sup>	-	B-ALL (13%) and T-ALL (33%) B-ALL (40%)	[207]
TCF3-PBX1 ( <i>Cre</i> -driving <i>TCF3</i> promoter)	- Pax5 <sup>+/-</sup>	Partial blockage at pro-B/pre-B stage	B-ALL (Cd19- <i>Cre</i> , 7%) B-ALL (Mb1- <i>Cre</i> , 53%) B-ALL (Mx1- <i>Cre</i> , 59%) <i>Ptpn11</i> , <i>Kras</i> , <i>Nras</i> , <i>Jak1</i> , <i>Jak3</i> and <i>Il7r</i> mutations <i>Cdkn2a</i> deletions	[186]
BCR-ABL1 ( <i>Sca1</i> promoter)	- Pax5 <sup>+/-</sup>	Pre-leukemic <i>BCR-ABL1</i> HSPCs Pro-B/pre-B cells permissive for B-ALL development	B-ALL (low penetrance) B-ALL (high penetrance, ~10 months)	[208]

## 5. Targeting Cell- and Non-Cell-Autonomous Properties of (Pre-)LSCs

The search for more targeted therapies remains an important challenge based on an understanding of both cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms involved in leukemia initiation and propagation. Targeting genes encoding for key players in controlling proliferation and differentiation in leukemia remains a dream and, unfortunately, represents very few examples of success in the clinic so far. In addition, most transcription factors, which exert intrinsic functions on cancer cells, are considered “undruggable” by small molecules or blocking antibodies due to their structural configurations, their protein–protein or protein–DNA interactions and their cellular localizations [209,210]. Despite this, the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL) represents a prime example of a drug combination that targets both differentiation blockade and the self-renewal activity of LSCs through the proteasome-dependent degradation of the PML-RAR $\alpha$  fusion protein, as described in the pioneer work from de Thé and colleagues [211,212]. This strategy underscores the importance of targeting the oncoprotein functions as this allowed for a more than 90% cure rate and very rare relapses, representing a major success in the field of hematologic malignancies [213]. In addition, this demonstrates the proof of concept that targeted degradation of a driver oncogenic transcription factor, along with its associated self-renewal and stem cell-like functions, is the strategy of choice for the long-term cure of leukemia. In ALL, while deciphering the diversity of the different oncogenic subtypes associated with their altered signaling pathways led to the discovery of new therapeutic opportunities [18,19], a significant proportion of patients still have unsatisfactory outcomes. Thus, the importance of challenging therapeutic approaches and of finding new druggable targets that enhance anti-leukemic efficiency remains a topical issue. In that purpose and as a representative example of targeted therapy, it has been demonstrated that the demethylase activity of UTX is essential for the maintenance of SCL/TAL1-positive T-ALL and not for other oncogenic subtypes [214]. Consistently, pharmacological inhibition of UTX with the H3K27 demethylase inhibitor GSK-J4 selectively targets SCL/TAL1-positive leukemic cells. Based on this targeted epigenetic vulnerability, the authors proposed for the first time a subtype-specific therapy in T-ALL [214].

The current cancer therapies target proliferating and metabolically active cancer cells and efficiently reduce the tumor load. However, frequent relapses indicate the persistence of residual resistant cells that escape treatment likely due to a protective microenvironment that blunt their chemosensitivity [215–219]. Indeed, specific locations within the niche may modify the chemosensitivity of primary leukemic blasts [58,220]. In addition, growing evidence supports the notion that leukemic cells can remodel their niche into an abnormal environment that contributes to neoplastic progression at the expense of normal hematopoiesis [221]. Thus, the interactions between leukemic cells with the molecular cues provided by their microenvironment are critical to promote leukemia progression and to design new targeted therapies, as is well documented elsewhere both in T-ALL [222,223] and in B-ALL [224]. Interestingly, non-cell-autonomous mechanisms can control the vulnerability of leukemic cells upon treatment, as exemplified by mitochondria transfer from activated stromal cells to rescue ALL cells from drug-induced oxidative stress [225]. Non-cell-autonomous pathways can also be exploited to develop therapeutic opportunities, as recently documented by Van Vlierberghe and colleagues showing that endogenous IL7, a cytokine abundantly secreted by the microenvironment, collaborates with glucocorticoids to reveal the sensitivity of residual leukemic cells upon the PIM inhibitor [226,227]. Together, the impact of extrinsic signals in leukemic cells, especially the molecular crosstalk between (pre-)LSCs and their microenvironment should be considered to develop new therapeutic approaches. Modifying the BM niche represents an innovative therapeutic approach to prevent leukemia re-initiation from residual (pre-)LSCs after complete remission. Thus, there is a need to characterize the adhesion molecules and soluble factors involved in the crosstalk between (pre-)LSCs and BM stromal cells. While the *in vivo* method stays the gold standard approach to study the molecular interactions between (pre-)LSCs and the BM microenvironment, a 3D organotypic “leukemia on-a-chip” microphysiological

system has been recently developed. This ex vivo bioengineered strategy recapitulates the heterogeneity of the leukemic BM microenvironment and opens the opportunity to perform a niche-based drug screening assay [228].

As described previously using transgenic T-ALL models, a primary oncogene can introduce cell quiescence, drug resistance and self-renewal to pre-LSCs [132,133], three critical properties that can be controlled by their niches. Thus, the development of new drugs targeting specific non-cell-autonomous mechanisms in (pre-)LSCs could open new therapeutic opportunities for more selective treatments. This notion has recently been exploited through the demonstration that a potent inhibitor of dynamin GTPase activity overcome the chemoresistance of pre-LSCs by inhibiting the transduction of key signaling pathways provided by the microenvironment [229]. Therefore, the reliance of leukemic cells on their niches and on non-cell-autonomous pathways together with the failure of chemotherapy in a significant proportion of patients point to the need for novel drug screening strategies incorporating elements of the microenvironment. This has been challenged by the design of the niche-based screening in multiple myeloma (MM) to identify Food and Drug Administration (FDA)-approved compounds that overcome stroma-induced drug resistance [230]. Precisely, this strategy led to the discovery of a chemical inhibitor specifically targeting microtubule-bound kinesin-5 in MM cells and allowing a greater selectivity over normal hematopoietic cells [230]. Obviously, the major limit is to target these (pre-)LSCs in primary patient samples, which are not easily amenable to high-throughput screening (HTS) for drug discovery due to their extreme rarity. Despite this, the critical dependency of primary (pre-)LSCs for their microenvironment has been challenged by the design of miniaturized, niche-based assays for chemical screening strategies using both *MLL-AF9*-induced AML [231] and *SCL-LMO1*-induced T-ALL [132] models. The latter led to the identification of the 2-methoxyestradiol, an FDA-approved drug inhibiting both the cell-intrinsic SCL oncoprotein and the stroma-dependent NOTCH1-Myc pathway, together with an absence of toxicity towards normal HSC functions. As previously reported, *MYC* is indeed essential for NOTCH1 activity in T-ALL [232,233], and inhibiting *Myc* expression via a BRD4 inhibitor effectively killed leukemia-initiating cells [234,235].

Collectively, recapitulating tissue-like properties of primary (pre-)LSCs represents a promising avenue for developing new cancer therapies. In addition, drug repositioning seems to be a powerful alternative strategy to discover novel biological applications of existing drugs that have a well-established dose regimen with favorable pharmacokinetics and pharmacodynamics properties as well as tolerable side effects [236]. In addition, drug repositioning should significantly reduce the time and the cost of the pre-clinical trial. Therefore, the chemical screen of FDA-approved compounds represents an attractive approach to the discovery of novel biological applications of a known drug and its rapid translation to the clinic.

## 6. Conclusions

The leukemic stem cell concept has important clinical implications and is already applied for patient stratification and for the development of more effective therapies against hematopoietic malignancies. In this review, we presented multiple lines of evidence for the complexity of leukemic cells from ALL patients that include cellular, molecular, genetic and functional heterogeneity. We described the different technological approaches that led to the recognition that leukemic cells evolve towards a nonlinear evolution process during the progression of the disease. Then, we focused on the development of improved methods, particularly the use of transgenic mice, to detect, purify and characterize pre-malignant stem cells before they have acquired additional genetic alterations and propagating properties. We described how a primary oncogenic transcription factor can reprogram stem cell-like functions to normal progenitors, such as self-renewal and cell dormancy, and that led to the emergence of pre-LSCs. Finally, we discussed the biological as well as the clinical importance of studying and targeting the intrinsic and extrinsic properties of pre-LSCs.



Over the last decade, genome-wide studies greatly improved the classification of ALL patients, enabling the identification of diverse and heterogeneous oncogenic subtypes that led to a better patient stratification, clinical prognosis and treatment orientation. Despite considerable improvements in overall survival, a significant proportion of ALL patients still have unsatisfactory outcomes. Moreover, the finding of therapeutic strategies targeting both the self-renewal and differentiation blockade of leukemic cells in ALL has not yet been achieved. Based on a better understanding of the intratumoral heterogeneity and on the deciphering of both the cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms driving the emergence of leukemia-initiating cells, we expect in the near future the identification of new druggable targets and therapeutic opportunities that might render ALL a curable disease.

**Funding:** This research received no external funding.

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

## References

1. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wuputra, K.; Ku, C.C.; Wu, D.C.; Lin, Y.C.; Saito, S.; Yokoyama, K.K. Prevention of tumor risk associated with the reprogramming of human pluripotent stem cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2020**, *39*, 100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bradner, J.E.; Hnisz, D.; Young, R.A. Transcriptional addiction in cancer. *Cell* **2017**, *168*, 629–643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Malta, T.M.; Sokolov, A.; Gentles, A.J.; Burzykowski, T.; Poisson, L.; Weinstein, J.N.; Kaminska, B.; Huelsken, J.; Omberg, L.; Gevaert, O.; et al. Machine learning identifies stemness features associated with oncogenic dedifferentiation. *Cell* **2018**, *173*, 338–354. [[CrossRef](#)]
5. Swiers, G.; Patient, R.; Loose, M. Genetic regulatory networks programming hematopoietic stem cells and erythroid lineage specification. *Dev. Biol.* **2006**, *294*, 525–540. [[CrossRef](#)]
6. Sloma, I.; Jiang, X.; Eaves, A.C.; Eaves, C.J. Insights into the stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **2010**, *24*, 1823–1833. [[CrossRef](#)]
7. Fialkow, P.J.; Gartler, S.M.; Yoshida, A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *58*, 1468–1471. [[CrossRef](#)]
8. Lapidot, T.; Sirard, C.; Vormoor, J.; Murdoch, B.; Hoang, T.; Caceres-Cortes, J.; Minden, M.; Paterson, B.; Caligiuri, M.A.; Dick, J.E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into scid mice. *Nature* **1994**, *367*, 645–648. [[CrossRef](#)]
9. Bonnet, D.; Dick, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 730–737. [[CrossRef](#)]
10. Bereshchenko, O.; Mancini, E.; Moore, S.; Bilbao, D.; Mansson, R.; Luc, S.; Grover, A.; Jacobsen, S.E.; Bryder, D.; Nerlov, C. Hematopoietic stem cell expansion precedes the generation of committed myeloid leukemia-initiating cells in *c/ebpalpha* mutant aml. *Cancer Cell* **2009**, *16*, 390–400. [[CrossRef](#)]
11. Miyamoto, T.; Weissman, I.L.; Akashi, K. Aml1/eto-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7521–7526. [[CrossRef](#)]
12. Huntly, B.J.; Shigematsu, H.; Deguchi, K.; Lee, B.H.; Mizuno, S.; Duclos, N.; Rowan, R.; Amaral, S.; Curley, D.; Williams, I.R.; et al. Moz-tif2, but not bcr-abl, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 587–596. [[CrossRef](#)]
13. Krivtsov, A.V.; Twomey, D.; Feng, Z.; Stubbs, M.C.; Wang, Y.; Faber, J.; Levine, J.E.; Wang, J.; Hahn, W.C.; Gilliland, D.G.; et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by *mll-af9*. *Nature* **2006**, *442*, 818–822. [[CrossRef](#)]
14. Cozzio, A.; Passegue, E.; Ayton, P.M.; Karsunky, H.; Cleary, M.L.; Weissman, I.L. Similar *mll*-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 3029–3035. [[CrossRef](#)]
15. Guibal, F.C.; Alberich-Jorda, M.; Hirai, H.; Ebralidze, A.; Levantini, E.; Di Ruscio, A.; Zhang, P.; Santana-Lemos, B.A.; Neuberg, D.; Wagers, A.J.; et al. Identification of a myeloid committed progenitor as the cancer-initiating cell in acute promyelocytic leukemia. *Blood* **2009**, *114*, 5415–5425. [[CrossRef](#)]
16. Wojtiski, S.; Guibal, F.C.; Kindler, T.; Lee, B.H.; Jesneck, J.L.; Fabian, A.; Tenen, D.G.; Gilliland, D.G. Pml-raralpha initiates leukemia by conferring properties of self-renewal to committed promyelocytic progenitors. *Leukemia* **2009**, *23*, 1462–1471. [[CrossRef](#)]
17. Inaba, H.; Pui, C.H. Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1926. [[CrossRef](#)]
18. Lato, M.W.; Przysucha, A.; Grosman, S.; Zawitkowska, J.; Lejman, M. The new therapeutic strategies in pediatric t-cell acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4502. [[CrossRef](#)]
19. Ratti, S.; Lonetti, A.; Follo, M.Y.; Paganelli, F.; Martelli, A.M.; Chiarini, F.; Evangelisti, C. B-all complexity: Is targeted therapy still a valuable approach for pediatric patients? *Cancers* **2020**, *12*, 3498. [[CrossRef](#)]
20. Tardif, M.; Souza, A.; Krajcinovic, M.; Bittencourt, H.; Tran, T.H. Molecular-based and antibody-based targeted pharmacological approaches in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin. Pharmacother.* **2021**, *22*, 1871–1887. [[CrossRef](#)]

21. Valent, P.; Bonnet, D.; De Maria, R.; Lapidot, T.; Copland, M.; Melo, J.V.; Chomienne, C.; Ishikawa, F.; Schuringa, J.J.; Stassi, G.; et al. Cancer stem cell definitions and terminology: The devil is in the details. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 767–775. [[CrossRef](#)]
22. Till, J.E.; Mc, C.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **1961**, *14*, 213–222. [[CrossRef](#)]
23. Spangrude, G.J.; Heimfeld, S.; Weissman, I.L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **1988**, *241*, 58–62. [[CrossRef](#)]
24. Morrison, S.J.; Weissman, I.L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* **1994**, *1*, 661–673. [[CrossRef](#)]
25. Osawa, M.; Hanada, K.; Hamada, H.; Nakauchi, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single cd34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **1996**, *273*, 242–245. [[CrossRef](#)]
26. Berenson, R.J.; Andrews, R.G.; Bensinger, W.I.; Kalamasz, D.; Knitter, G.; Buckner, C.D.; Bernstein, I.D. Antigen cd34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J. Clin. Investig.* **1988**, *81*, 951–955. [[CrossRef](#)]
27. Bhatia, M.; Wang, J.C.; Kapp, U.; Bonnet, D.; Dick, J.E. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 5320–5325. [[CrossRef](#)]
28. Kreso, A.; Dick, J.E. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* **2014**, *14*, 275–291. [[CrossRef](#)]
29. Hope, K.J.; Jin, L.; Dick, J.E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 738–743. [[CrossRef](#)]
30. Ishikawa, F.; Yoshida, S.; Saito, Y.; Hijikata, A.; Kitamura, H.; Tanaka, S.; Nakamura, R.; Tanaka, T.; Tomiyama, H.; Saito, N.; et al. Chemotherapy-resistant human aml stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1315–1321. [[CrossRef](#)]
31. Eppert, K.; Takenaka, K.; Lechman, E.R.; Waldron, L.; Nilsson, B.; van Galen, P.; Metzeler, K.H.; Poepl, A.; Ling, V.; Beyene, J.; et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1086–1093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Goardon, N.; Marchi, E.; Atzberger, A.; Quek, L.; Schuh, A.; Soneji, S.; Woll, P.; Mead, A.; Alford, K.A.; Rout, R.; et al. Coexistence of lmp-like and gmp-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **2011**, *19*, 138–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sarry, J.E.; Murphy, K.; Perry, R.; Sanchez, P.V.; Secreto, A.; Keefer, C.; Swider, C.R.; Strzelecki, A.C.; Cavelier, C.; Recher, C.; et al. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in nod/scid/il2rgammac-deficient mice. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 384–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Thomas, D.; Majeti, R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* **2017**, *129*, 1577–1585. [[CrossRef](#)]
35. Taussig, D.C.; Miraki-Moud, F.; Anjos-Afonso, F.; Pearce, D.J.; Allen, K.; Ridler, C.; Lillington, D.; Oakervee, H.; Cavenagh, J.; Agrawal, S.G.; et al. Anti-cd38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* **2008**, *112*, 568–575. [[CrossRef](#)]
36. Greaves, M. Leukaemia ‘firsts’ in cancer research and treatment. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 163–172. [[CrossRef](#)]
37. Lang, F.; Wojcik, B.; Rieger, M.A. Stem cell hierarchy and clonal evolution in acute lymphoblastic leukemia. *Stem Cells Int.* **2015**, *2015*, 137164. [[CrossRef](#)]
38. Cobaleda, C.; Gutierrez-Cianca, N.; Perez-Losada, J.; Flores, T.; Garcia-Sanz, R.; Gonzalez, M.; Sanchez-Garcia, I. A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2000**, *95*, 1007–1013. [[CrossRef](#)]
39. Cox, C.V.; Evely, R.S.; Oakhill, A.; Pamphilon, D.H.; Goulden, N.J.; Blair, A. Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* **2004**, *104*, 2919–2925. [[CrossRef](#)]
40. Hotfilder, M.; Rottgers, S.; Rosemann, A.; Jurgens, H.; Harbott, J.; Vormoor, J. Immature cd34+cd19- progenitor/stem cells in tel/aml1-positive acute lymphoblastic leukemia are genetically and functionally normal. *Blood* **2002**, *100*, 640–646. [[CrossRef](#)]
41. Castor, A.; Nilsson, L.; Astrand-Grundstrom, I.; Buitenhuis, M.; Ramirez, C.; Anderson, K.; Strombeck, B.; Garwicz, S.; Bekassy, A.N.; Schmiegelow, K.; et al. Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 630–637. [[CrossRef](#)]
42. Kong, Y.; Yoshida, S.; Saito, Y.; Doi, T.; Nagatoshi, Y.; Fukata, M.; Saito, N.; Yang, S.M.; Iwamoto, C.; Okamura, J.; et al. Cd34+cd38+cd19+ as well as cd34+cd38-cd19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human b-precursor all. *Leukemia* **2008**, *22*, 1207–1213. [[CrossRef](#)]
43. Le Viseur, C.; Hotfilder, M.; Bomken, S.; Wilson, K.; Rottgers, S.; Schrauder, A.; Rosemann, A.; Irving, J.; Stam, R.W.; Shultz, L.D.; et al. In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer Cell* **2008**, *14*, 47–58. [[CrossRef](#)]
44. Aoki, Y.; Watanabe, T.; Saito, Y.; Kuroki, Y.; Hijikata, A.; Takagi, M.; Tomizawa, D.; Eguchi, M.; Eguchi-Ishimae, M.; Kaneko, A.; et al. Identification of cd34+ and cd34- leukemia-initiating cells in mll-rearranged human acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2015**, *125*, 967–980. [[CrossRef](#)]
45. Rehe, K.; Wilson, K.; Bomken, S.; Williamson, D.; Irving, J.; den Boer, M.L.; Stanulla, M.; Schrappe, M.; Hall, A.G.; Heidenreich, O.; et al. Acute b lymphoblastic leukaemia-propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 38–51. [[CrossRef](#)]
46. Elder, A.; Bomken, S.; Wilson, I.; Blair, H.J.; Cockell, S.; Ponthan, F.; Dormon, K.; Pal, D.; Heidenreich, O.; Vormoor, J. Abundant and equipotent founder cells establish and maintain acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* **2017**, *31*, 2577–2586. [[CrossRef](#)]

47. Lang, F.; Wojcik, B.; Bothur, S.; Knecht, C.; Falkenburg, J.H.; Schroeder, T.; Serve, H.; Ottmann, O.G.; Rieger, M.A. Plastic cd34 and cd38 expression in adult b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia explains ambiguity of leukemia-initiating stem cell populations. *Leukemia* **2017**, *31*, 731–734. [[CrossRef](#)]
48. Orlando, E.J.; Han, X.; Tribouley, C.; Wood, P.A.; Leary, R.J.; Riester, M.; Levine, J.E.; Qayed, M.; Grupp, S.A.; Boyer, M.; et al. Genetic mechanisms of target antigen loss in car19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1504–1506. [[CrossRef](#)]
49. Rabilloud, T.; Potier, D.; Pankaew, S.; Nozais, M.; Loosveld, M.; Payet-Bornet, D. Single-cell profiling identifies pre-existing cd19-negative subclones in a b-all patient with cd19-negative relapse after car-t therapy. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 865. [[CrossRef](#)]
50. Sedek, L.; Theunissen, P.; Sobral da Costa, E.; van der Sluijs-Gelling, A.; Mejstrikova, E.; Gaipa, G.; Sonsala, A.; Twardoch, M.; Oliveira, E.; Novakova, M.; et al. Differential expression of cd73, cd86 and cd304 in normal vs. Leukemic b-cell precursors and their utility as stable minimal residual disease markers in childhood b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *J. Immunol. Methods* **2019**, *475*, 112429. [[CrossRef](#)]
51. Tsitsikov, E.; Harris, M.H.; Silverman, L.B.; Sallan, S.E.; Weinberg, O.K. Role of cd81 and cd58 in minimal residual disease detection in pediatric b lymphoblastic leukemia. *Int. J. Lab. Hematol.* **2018**, *40*, 343–351. [[CrossRef](#)]
52. Armstrong, F.; de la Grange, P.B.; Gerby, B.; Rouyez, M.C.; Calvo, J.; Fontenay, M.; Boissel, N.; Dombret, H.; Baruchel, A.; Landman-Parker, J.; et al. Notch is a key regulator of human t-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood* **2009**, *113*, 1730–1740. [[CrossRef](#)]
53. Cox, C.V.; Martin, H.M.; Kearns, P.R.; Virgo, P.; Evely, R.S.; Blair, A. Characterization of a progenitor cell population in childhood t-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2007**, *109*, 674–682. [[CrossRef](#)]
54. Gerby, B.; Clappier, E.; Armstrong, F.; Deswarte, C.; Calvo, J.; Poglio, S.; Soulier, J.; Boissel, N.; Leblanc, T.; Baruchel, A.; et al. Expression of cd34 and cd7 on human t-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations. *Leukemia* **2011**, *25*, 1249–1258. [[CrossRef](#)]
55. Chiu, P.P.; Jiang, H.; Dick, J.E. Leukemia-initiating cells in human t-lymphoblastic leukemia exhibit glucocorticoid resistance. *Blood* **2010**, *116*, 5268–5279. [[CrossRef](#)]
56. Ma, W.; Gutierrez, A.; Goff, D.J.; Geron, I.; Sadarangani, A.; Jamieson, C.A.; Court, A.C.; Shih, A.Y.; Jiang, Q.; Wu, C.C.; et al. Notch1 signaling promotes human t-cell acute lymphoblastic leukemia initiating cell regeneration in supportive niches. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39725.
57. Poglio, S.; Lewandowski, D.; Calvo, J.; Caye, A.; Gros, A.; Laharanne, E.; Leblanc, T.; Landman-Parker, J.; Baruchel, A.; Soulier, J.; et al. Speed of leukemia development and genetic diversity in xenograft models of t cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* **2016**, *7*, 41599–41611. [[CrossRef](#)]
58. Cahu, X.; Calvo, J.; Poglio, S.; Prade, N.; Colsch, B.; Arcangeli, M.-L.; Leblanc, T.; Petit, A.; Baleyrier, F.; Baruchel, A.; et al. Bone marrow sites differently imprint dormancy and chemoresistance to T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv.* **2017**, *1*, 1760–1772. [[CrossRef](#)]
59. Ebinger, S.; Ozdemir, E.Z.; Ziegenhain, C.; Tiedt, S.; Castro Alves, C.; Grunert, M.; Dworzak, M.; Lutz, C.; Turati, V.A.; Enver, T.; et al. Characterization of rare, dormant, and therapy-resistant cells in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 849–862. [[CrossRef](#)]
60. Yan, F.; Wong, N.C.; Powell, D.R.; Curtis, D.J. A 9-gene score for risk stratification in b-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2020**, *34*, 3070–3074. [[CrossRef](#)]
61. Ng, S.W.; Mitchell, A.; Kennedy, J.A.; Chen, W.C.; McLeod, J.; Ibrahimova, N.; Arruda, A.; Popescu, A.; Gupta, V.; Schimmer, A.D.; et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature* **2016**, *540*, 433–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Inaba, H.; Mullighan, C.G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **2020**, *105*, 2524–2539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kimura, S.; Mullighan, C.G. Molecular markers in all: Clinical implications. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2020**, *33*, 101193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Alexandrov, L.B.; Nik-Zainal, S.; Wedge, D.C.; Aparicio, S.A.; Behjati, S.; Biankin, A.V.; Bignell, G.R.; Bolli, N.; Borg, A.; Borresen-Dale, A.L.; et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **2013**, *500*, 415–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Anderson, K.; Lutz, C.; van Delft, F.W.; Bateman, C.M.; Guo, Y.; Colman, S.M.; Kempinski, H.; Moorman, A.V.; Tittley, I.; Swansbury, J.; et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* **2011**, *469*, 356–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Mullighan, C.G.; Phillips, L.A.; Su, X.; Ma, J.; Miller, C.B.; Shurtleff, S.A.; Downing, J.R. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* **2008**, *322*, 1377–1380. [[CrossRef](#)]
67. Mullighan, C.G.; Zhang, J.; Kasper, L.H.; Lerach, S.; Payne-Turner, D.; Phillips, L.A.; Heatley, S.L.; Holmfeldt, L.; Collins-Underwood, J.R.; Ma, J.; et al. Crebbp mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **2011**, *471*, 235–239. [[CrossRef](#)]
68. Yang, J.J.; Bhojwani, D.; Yang, W.; Cai, X.; Stocco, G.; Crews, K.; Wang, J.; Morrison, D.; Devidas, M.; Hunger, S.P.; et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2008**, *112*, 4178–4183. [[CrossRef](#)]
69. Tosello, V.; Mansour, M.R.; Barnes, K.; Paganin, M.; Sulis, M.L.; Jenkinson, S.; Allen, C.G.; Gale, R.E.; Linch, D.C.; Palomero, T.; et al. Wt1 mutations in t-all. *Blood* **2009**, *114*, 1038–1045. [[CrossRef](#)]

70. Kuster, L.; Grausenburger, R.; Fuka, G.; Kaindl, U.; Krapf, G.; Inthal, A.; Mann, G.; Kauer, M.; Rainer, J.; Kofler, R.; et al. Etv6/runx1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. *Blood* **2011**, *117*, 2658–2667. [[CrossRef](#)]
71. Van Delft, F.W.; Horsley, S.; Colman, S.; Anderson, K.; Bateman, C.; Kempfski, H.; Zuna, J.; Eckert, C.; Saha, V.; Kearney, L.; et al. Clonal origins of relapse in etv6-runx1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2011**, *117*, 6247–6254. [[CrossRef](#)]
72. Ribera, J.; Zamora, L.; Morgades, M.; Mallo, M.; Solanes, N.; Batlle, M.; Vives, S.; Granada, I.; Junca, J.; Malinverni, R.; et al. Copy number profiling of adult relapsed b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia reveals potential leukemia progression mechanisms. *Genes Chromosomes Cancer* **2017**, *56*, 810–820. [[CrossRef](#)]
73. Theunissen, P.M.J.; de Bie, M.; van Zessen, D.; de Haas, V.; Stubbs, A.P.; van der Velden, V.H.J. Next-generation antigen receptor sequencing of paired diagnosis and relapse samples of b-cell acute lymphoblastic leukemia: Clonal evolution and implications for minimal residual disease target selection. *Leuk. Res.* **2019**, *76*, 98–104. [[CrossRef](#)]
74. Forero-Castro, M.; Montano, A.; Robledo, C.; Garcia de Coca, A.; Fuster, J.L.; de Las Heras, N.; Queizan, J.A.; Hernandez-Sanchez, M.; Corchete-Sanchez, L.A.; Martin-Izquierdo, M.; et al. Integrated genomic analysis of chromosomal alterations and mutations in b-cell acute lymphoblastic leukemia reveals distinct genetic profiles at relapse. *Diagnostics* **2020**, *10*, 455. [[CrossRef](#)]
75. Waanders, E.; Gu, Z.; Dobson, S.M.; Antic, Z.; Crawford, J.C.; Ma, X.; Edmonson, M.N.; Payne-Turner, D.; van der Vorst, M.; Jongmans, M.C.J.; et al. Mutational landscape and patterns of clonal evolution in relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Discov.* **2020**, *1*, 96–111. [[CrossRef](#)]
76. Mullighan, C.G. Molecular genetics of b-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 3407–3415. [[CrossRef](#)]
77. Ma, X.; Edmonson, M.; Yergeau, D.; Muzny, D.M.; Hampton, O.A.; Rusch, M.; Song, G.; Easton, J.; Harvey, R.C.; Wheeler, D.A.; et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric b-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6604. [[CrossRef](#)]
78. Oshima, K.; Khiabani, H.; da Silva-Almeida, A.C.; Tzoneva, G.; Abate, F.; Ambesi-Impiombato, A.; Sanchez-Martin, M.; Carpenter, Z.; Penson, A.; Perez-Garcia, A.; et al. Mutational landscape, clonal evolution patterns, and role of ras mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 11306–11311. [[CrossRef](#)]
79. Jaiswal, S.; Fontanillas, P.; Flannick, J.; Manning, A.; Grauman, P.V.; Mar, B.G.; Lindsley, R.C.; Mermel, C.H.; Burt, N.; Chavez, A.; et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 2488–2498. [[CrossRef](#)]
80. Acuna-Hidalgo, R.; Sengul, H.; Steehouwer, M.; van de Vorst, M.; Vermeulen, S.H.; Kiemeny, L.; Veltman, J.A.; Gilissen, C.; Hoischen, A. Ultra-sensitive sequencing identifies high prevalence of clonal hematopoiesis-associated mutations throughout adult life. *Am. J. Hum. Genet.* **2017**, *101*, 50–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Bowman, R.L.; Busque, L.; Levine, R.L. Clonal hematopoiesis and evolution to hematopoietic malignancies. *Cell Stem Cell* **2018**, *22*, 157–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. 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.; et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* **2014**, *506*, 328–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Corces-Zimmerman, M.R.; Hong, W.J.; Weissman, I.L.; Medeiros, B.C.; Majeti, R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 2548–2553. [[CrossRef](#)]
84. Shlush, L.I.; Mitchell, A.; Heisler, L.; Abelson, S.; Ng, S.W.K.; Trotman-Grant, A.; Medeiros, J.J.F.; Rao-Bhatia, A.; Jaciw-Zurakowsky, I.; Marke, R.; et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature* **2017**, *547*, 104–108. [[CrossRef](#)]
85. Velten, L.; Story, B.A.; Hernandez-Malmierca, P.; Raffel, S.; Leonce, D.R.; Milbank, J.; Paulsen, M.; Demir, A.; Szu-Tu, C.; Fromel, R.; et al. Identification of leukemic and pre-leukemic stem cells by clonal tracking from single-cell transcriptomics. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1366. [[CrossRef](#)]
86. Clappier, E.; Gerby, B.; Sigaux, F.; Delord, M.; Touzri, F.; Hernandez, L.; Ballerini, P.; Baruchel, A.; Pflumio, F.; Soulier, J. Clonal selection in xenografted human t cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 653–661. [[CrossRef](#)]
87. Notta, F.; Mullighan, C.G.; Wang, J.C.; Poepl, A.; Doulatov, S.; Phillips, L.A.; Ma, J.; Minden, M.D.; Downing, J.R.; Dick, J.E. Evolution of human bcr-abl1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature* **2011**, *469*, 362–367. [[CrossRef](#)]
88. Bardini, M.; Woll, P.S.; Corral, L.; Luc, S.; Wittmann, L.; Ma, Z.; Lo Nigro, L.; Basso, G.; Biondi, A.; Cazzaniga, G.; et al. Clonal variegation and dynamic competition of leukemia-initiating cells in infant acute lymphoblastic leukemia with mll rearrangement. *Leukemia* **2015**, *29*, 38–50. [[CrossRef](#)]
89. Richter-Pechanska, P.; Kunz, J.B.; Bornhauser, B.; von Knebel Doeberitz, C.; Rausch, T.; Erarslan-Uysal, B.; Assenov, Y.; Frismantas, V.; Marovca, B.; Waszak, S.M.; et al. Pdx models recapitulate the genetic and epigenetic landscape of pediatric t-cell leukemia. *EMBO Mol. Med.* **2018**, *10*, e9443. [[CrossRef](#)]
90. Wang, K.; Sanchez-Martin, M.; Wang, X.; Knapp, K.M.; Koche, R.; Vu, L.; Nahas, M.K.; He, J.; Hadler, M.; Stein, E.M.; et al. Patient-derived xenotransplants can recapitulate the genetic driver landscape of acute leukemias. *Leukemia* **2017**, *31*, 151–158. [[CrossRef](#)]
91. Dobson, S.M.; Garcia-Prat, L.; Vanner, R.J.; Wintersinger, J.; Waanders, E.; Gu, Z.; McLeod, J.; Gan, O.I.; Grandal, I.; Payne-Turner, D.; et al. Relapse-fated latent diagnosis subclones in acute b lineage leukemia are drug tolerant and possess distinct metabolic programs. *Cancer Discov.* **2020**, *10*, 568–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

92. Van Galen, P.; Kreso, A.; Mbong, N.; Kent, D.G.; Fitzmaurice, T.; Chambers, J.E.; Xie, S.; Laurenti, E.; Hermans, K.; Eppert, K.; et al. The unfolded protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress. *Nature* **2014**, *510*, 268–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Van Galen, P.; Mbong, N.; Kreso, A.; Schoof, E.M.; Wagenblast, E.; Ng, S.W.K.; Krivdova, G.; Jin, L.; Nakauchi, H.; Dick, J.E. Integrated stress response activity marks stem cells in normal hematopoiesis and leukemia. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 1109–1117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Spitzer, M.H.; Nolan, G.P. Mass cytometry: Single cells, many features. *Cell* **2016**, *165*, 780–791. [[CrossRef](#)]
95. Good, Z.; Sarno, J.; Jager, A.; Samusik, N.; Aghaepour, N.; Simonds, E.F.; White, L.; Lacayo, N.J.; Fantl, W.J.; Fazio, G.; et al. Single-cell developmental classification of b cell precursor acute lymphoblastic leukemia at diagnosis reveals predictors of relapse. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 474–483. [[CrossRef](#)]
96. Bendall, S.C.; Davis, K.L.; Amir, E.-A.D.; Tadmor, M.D.; Simonds, E.F.; Chen, T.J.; Shenfeld, D.K.; Nolan, G.P.; Pe'er, D. Single-cell trajectory detection uncovers progression and regulatory coordination in human b cell development. *Cell* **2014**, *157*, 714–725. [[CrossRef](#)]
97. Chan, L.N.; Murakami, M.A.; Robinson, M.E.; Caesar, R.; Sadras, T.; Lee, J.; Cosgun, K.N.; Kume, K.; Khairnar, V.; Xiao, G.; et al. Signalling input from divergent pathways subverts b cell transformation. *Nature* **2020**, *583*, 845–851. [[CrossRef](#)]
98. Alberti-Servera, L.; Demeyer, S.; Govaerts, I.; Swings, T.; de Bie, J.; Gielen, O.; Brociner, M.; Michaux, L.; Maertens, J.; Uytendaele, A.; et al. Single-cell DNA amplicon sequencing reveals clonal heterogeneity and evolution in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2021**, *137*, 801–811. [[CrossRef](#)]
99. Greaves, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 471–484. [[CrossRef](#)]
100. Hong, D.; Gupta, R.; Ancliff, P.; Atzberger, A.; Brown, J.; Soneji, S.; Green, J.; Colman, S.; Piacibello, W.; Buckle, V.; et al. Initiating and cancer-propagating cells in tel-aml1-associated childhood leukemia. *Science* **2008**, *319*, 336–339. [[CrossRef](#)]
101. De Guzman, C.G.; Warren, A.J.; Zhang, Z.; Gartland, L.; Erickson, P.; Drabkin, H.; Hiebert, S.W.; Klug, C.A. Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the aml1-eto translocation. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 5506–5517. [[CrossRef](#)]
102. Chen, W.; Kumar, A.R.; Hudson, W.A.; Li, Q.; Wu, B.; Staggs, R.A.; Lund, E.A.; Sam, T.N.; Kersey, J.H. Malignant transformation initiated by ml1-af9: Gene dosage and critical target cells. *Cancer Cell* **2008**, *13*, 432–440. [[CrossRef](#)]
103. Passegue, E.; Wagner, E.F.; Weissman, I.L. Junb deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell* **2004**, *119*, 431–443. [[CrossRef](#)]
104. Shimizu, R.; Kuroha, T.; Ohneda, O.; Pan, X.; Ohneda, K.; Takahashi, S.; Philipsen, S.; Yamamoto, M. Leukemogenesis caused by incapacitated gata-1 function. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 10814–10825. [[CrossRef](#)]
105. Rodrigues, N.P.; Tipping, A.J.; Wang, Z.; Enver, T. Gata-2 mediated regulation of normal hematopoietic stem/progenitor cell function, myelodysplasia and myeloid leukemia. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2012**, *44*, 457–460. [[CrossRef](#)]
106. Smith, L.J.; Curtis, J.E.; Messner, H.A.; Senn, J.S.; Furthmayr, H.; McCulloch, E.A. Lineage infidelity in acute leukemia. *Blood* **1983**, *61*, 1138–1145. [[CrossRef](#)]
107. Alexander, T.B.; Gu, Z.; Iacobucci, I.; Dickerson, K.; Choi, J.K.; Xu, B.; Payne-Turner, D.; Yoshihara, H.; Loh, M.L.; Horan, J.; et al. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature* **2018**, *562*, 373–379. [[CrossRef](#)]
108. Peaudecerf, L.; Krenn, G.; Goncalves, P.; Vasseur, F.; Rocha, B. Thymocytes self-renewal: A major hope or a major threat? *Immunol. Rev.* **2016**, *271*, 173–184. [[CrossRef](#)]
109. Han, J.; Zuniga-Pflucker, J.C. A 2020 view of thymus stromal cells in t cell development. *J. Immunol.* **2021**, *206*, 249–256. [[CrossRef](#)]
110. Tremblay, C.S.; Hoang, T.; Hoang, T. Early t cell differentiation lessons from t-cell acute lymphoblastic leukemia. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2010**, *92*, 121–156.
111. McCormack, M.P.; Young, L.F.; Vasudevan, S.; de Graaf, C.A.; Codrington, R.; Rabbitts, T.H.; Jane, S.M.; Curtis, D.J. The lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. *Science* **2010**, *327*, 879–883. [[CrossRef](#)]
112. Wilson, N.K.; Foster, S.D.; Wang, X.; Knezevic, K.; Schutte, J.; Kaimakis, P.; Chilarska, P.M.; Kinston, S.; Ouwehand, W.H.; Dzierzak, E.; et al. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: Genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 532–544. [[CrossRef](#)]
113. Herblot, S.; Steff, A.M.; Hugo, P.; Aplan, P.D.; Hoang, T. Scl and lmo1 alter thymocyte differentiation: Inhibition of e2a-heb function and pre-t alpha chain expression. *Nat. Immunol.* **2000**, *1*, 138–144. [[CrossRef](#)]
114. Gerby, B.; Tremblay, C.S.; Tremblay, M.; Rojas-Sutterlin, S.; Herblot, S.; Hebert, J.; Sauvageau, G.; Lemieux, S.; Lecuyer, E.; Veiga, D.F.; et al. Scl, lmo1 and notch1 reprogram thymocytes into self-renewing cells. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004768. [[CrossRef](#)]
115. Goossens, S.; van Vlierberghe, P. Controlling pre-leukemic thymocyte self-renewal. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Curtis, D.J.; Hall, M.A.; van Stekelenburg, L.J.; Robb, L.; Jane, S.M.; Begley, C.G. Scl is required for normal function of short-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* **2004**, *103*, 3342–3348. [[CrossRef](#)]
117. Reynaud, D.; Ravet, E.; Titeux, M.; Mazurier, F.; Renia, L.; Dubart-Kupperschmitt, A.; Romeo, P.H.; Pflumio, F. Scl/tal1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. *Blood* **2005**, *106*, 2318–2328. [[CrossRef](#)]
118. Lacombe, J.; Herblot, S.; Rojas-Sutterlin, S.; Haman, A.; Barakat, S.; Iscove, N.N.; Sauvageau, G.; Hoang, T. Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood* **2010**, *115*, 792–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

119. Souroullas, G.P.; Salmon, J.M.; Sablitzky, F.; Curtis, D.J.; Goodell, M.A. Adult hematopoietic stem and progenitor cells require either *lyl1* or *scl* for survival. *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 180–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. McCormack, M.P.; Shields, B.J.; Jackson, J.T.; Nasa, C.; Shi, W.; Slater, N.J.; Tremblay, C.S.; Rabbitts, T.H.; Curtis, D.J. Requirement for *lyl1* in a model of *lmo2*-driven early t-cell precursor all. *Blood* **2013**, *122*, 2093–2103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Tremblay, M.; Tremblay, C.S.; Herblot, S.; Aplan, P.D.; Hebert, J.; Perreault, C.; Hoang, T. Modeling t-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the *scl* and *lmo1* oncogenes. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 1093–1105. [[CrossRef](#)]
122. Shi, J.; Fallahi, M.; Luo, J.L.; Petrie, H.T. Nonoverlapping functions for *notch1* and *notch3* during murine steady-state thymic lymphopoiesis. *Blood* **2011**, *118*, 2511–2519. [[CrossRef](#)]
123. Radtke, F.; Wilson, A.; Mancini, S.J.; MacDonald, H.R. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 247–253. [[CrossRef](#)]
124. Mancini, S.J.; Mantei, N.; Dumortier, A.; Suter, U.; MacDonald, H.R.; Radtke, F. Jagged1-dependent notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* **2005**, *105*, 2340–2342. [[CrossRef](#)]
125. Maillard, I.; Koch, U.; Dumortier, A.; Shestova, O.; Xu, L.; Sai, H.; Pross, S.E.; Aster, J.C.; Bhandoola, A.; Radtke, F.; et al. Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **2008**, *2*, 356–366. [[CrossRef](#)]
126. Chiang, M.Y.; Shestova, O.; Xu, L.; Aster, J.C.; Pear, W.S. Divergent effects of supraphysiological notch signals on leukemia stem cells and hematopoietic stem cells. *Blood* **2012**, *121*, 905–917. [[CrossRef](#)]
127. Karanu, F.N.; Murdoch, B.; Gallacher, L.; Wu, D.M.; Koremoto, M.; Sakano, S.; Bhatia, M. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1365–1372. [[CrossRef](#)]
128. Varnum-Finney, B.; Xu, L.; Brashem-Stein, C.; Nourigat, C.; Flowers, D.; Bakkour, S.; Pear, W.S.; Bernstein, I.D. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive *notch1* signaling. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1278–1281. [[CrossRef](#)]
129. Weng, A.P.; Ferrando, A.A.; Lee, W.; Morris, J.P.; Silverman, L.B.; Sanchez-Irizarry, C.; Blacklow, S.C.; Look, A.T.; Aster, J.C. Activating mutations of *notch1* in human t cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **2004**, *306*, 269–271. [[CrossRef](#)]
130. O’Neil, J.; Calvo, J.; McKenna, K.; Krishnamoorthy, V.; Aster, J.C.; Bassing, C.H.; Alt, F.W.; Kelliher, M.; Look, A.T. Activating *notch1* mutations in mouse models of t-all. *Blood* **2006**, *107*, 781–785. [[CrossRef](#)]
131. Tatarek, J.; Cullion, K.; Ashworth, T.; Gerstein, R.; Aster, J.C.; Kelliher, M.A. *Notch1* inhibition targets the leukemia-initiating cells in a *tall1/lmo2* mouse model of t-all. *Blood* **2011**, *118*, 1579–1590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Gerby, B.; Veiga, D.F.; Kros, J.; Nourreddine, S.; Ouellette, J.; Haman, A.; Lavoie, G.; Fares, I.; Tremblay, M.; Litalien, V.; et al. High-throughput screening in niche-based assay identifies compounds to target preleukemic stem cells. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 4569–4584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Tremblay, C.S.; Saw, J.; Chiu, S.K.; Wong, N.C.; Tsyganov, K.; Ghotb, S.; Graham, A.N.; Yan, F.; Guirguis, A.A.; Sonderegger, S.E.; et al. Restricted cell cycle is essential for clonal evolution and therapeutic resistance of pre-leukemic stem cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Barnes, D.J.; Melo, J.V. Primitive, quiescent and difficult to kill: The role of non-proliferating stem cells in chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 2862–2866. [[CrossRef](#)]
135. Prost, S.; Relouzat, F.; Spentchian, M.; Ouzegdouh, Y.; Saliba, J.; Massonnet, G.; Beressi, J.P.; Verhoeven, E.; Ragueneau, V.; Maneglier, B.; et al. Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by *ppargamma* agonists. *Nature* **2015**, *525*, 380–383. [[CrossRef](#)]
136. Foudi, A.; Hochedlinger, K.; van Buren, D.; Schindler, J.W.; Jaenisch, R.; Carey, V.; Hock, H. Analysis of histone 2b-gfp retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 84–90. [[CrossRef](#)]
137. Wilson, A.; Laurenti, E.; Oser, G.; van der Wath, R.C.; Blanco-Bose, W.; Jaworski, M.; Offner, S.; Dunant, C.F.; Eshkind, L.; Bockamp, E.; et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **2008**, *135*, 1118–1129. [[CrossRef](#)]
138. Shields, B.J.; Slape, C.I.; Vo, N.; Jackson, J.T.; Pliego-Zamora, A.; Ranasinghe, H.; Shi, W.; Curtis, D.J.; McCormack, M.P. The *nup98-hoxd13* fusion oncogene induces thymocyte self-renewal via *lmo2/lyl1*. *Leukemia* **2019**, *33*, 1868–1880. [[CrossRef](#)]
139. Tardif, M.; Gerby, B.; Hoang, T. NUP98-PHF23 and NUP98-HOXD13 oncogenes confer aberrant self-renewal potential to thymocyte progenitors. *Exp. Hematol.* **2014**, *42*, S62. [[CrossRef](#)]
140. Batta, K.; Florkowska, M.; Kouskoff, V.; Lacaud, G. Direct reprogramming of murine fibroblasts to hematopoietic progenitor cells. *Cell Rep.* **2014**, *9*, 1871–1884. [[CrossRef](#)]
141. Garcia-Ramirez, I.; Bhatia, S.; Rodriguez-Hernandez, G.; Gonzalez-Herrero, I.; Walter, C.; Gonzalez de Tena-Davila, S.; Parvin, S.; Haas, O.; Woessmann, W.; Stanulla, M.; et al. *Lmo2* expression defines tumor cell identity during t-cell leukemogenesis. *EMBO J.* **2018**, *37*, e98783. [[CrossRef](#)]
142. Abdulla, H.; Vo, A.; Shields, B.J.; Davies, T.J.; Jackson, J.T.; Alserihi, R.; Viney, E.M.; Wong, T.; Yan, F.; Wong, N.C.; et al. T-all can evolve to oncogene independence. *Leukemia* **2021**, *35*, 2205–2219. [[CrossRef](#)]
143. Rodriguez-Hernandez, G.; Casado-Garcia, A.; Isidro-Hernandez, M.; Picard, D.; Raboso-Gallego, J.; Aleman-Arteaga, S.; Orfao, A.; Blanco, O.; Riesco, S.; Prieto-Matos, P.; et al. The second oncogenic hit determines the cell fate of *etv6-runx1* positive leukemia. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 704591. [[CrossRef](#)]
144. Hardy, R.R.; Li, Y.S.; Allman, D.; Asano, M.; Gui, M.; Hayakawa, K. B-cell commitment, development and selection. *Immunol. Rev.* **2000**, *175*, 23–32. [[CrossRef](#)]

145. Melchers, F. The pre-b-cell receptor: Selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the b-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 578–584. [[CrossRef](#)]
146. Meffre, E.; Casellas, R.; Nussenzweig, M.C. Antibody regulation of b cell development. *Nat. Immunol.* **2000**, *1*, 379–385. [[CrossRef](#)]
147. Nutt, S.L.; Heavey, B.; Rolink, A.G.; Busslinger, M. Commitment to the b-lymphoid lineage depends on the transcription factor pax5. *Nature* **1999**, *401*, 556–562. [[CrossRef](#)]
148. Cresson, C.; Peron, S.; Jamrog, L.; Rouquie, N.; Prade, N.; Dubois, M.; Hebrard, S.; Lagarde, S.; Gerby, B.; Mancini, S.J.C.; et al. Pax5a and pax5b isoforms are both efficient to drive b cell differentiation. *Oncotarget* **2018**, *9*, 32841–32854. [[CrossRef](#)]
149. Busslinger, M. Transcriptional control of early b cell development. *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 55–79. [[CrossRef](#)]
150. Souabni, A.; Cobaleda, C.; Schebesta, M.; Busslinger, M. Pax5 promotes b lymphopoiesis and blocks t cell development by repressing notch1. *Immunity* **2002**, *17*, 781–793. [[CrossRef](#)]
151. Nera, K.P.; Kohonen, P.; Narvi, E.; Peippo, A.; Mustonen, L.; Terho, P.; Koskela, K.; Buerstedde, J.M.; Lassila, O. Loss of pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* **2006**, *24*, 283–293. [[CrossRef](#)]
152. Urbanek, P.; Wang, Z.Q.; Fetka, I.; Wagner, E.F.; Busslinger, M. Complete block of early b cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking pax5/bsap. *Cell* **1994**, *79*, 901–912. [[CrossRef](#)]
153. Rolink, A.G.; Nutt, S.L.; Melchers, F.; Busslinger, M. Long-term in vivo reconstitution of t-cell development by pax5-deficient b-cell progenitors. *Nature* **1999**, *401*, 603–606. [[CrossRef](#)]
154. Schaniel, C.; Bruno, L.; Melchers, F.; Rolink, A.G. Multiple hematopoietic cell lineages develop in vivo from transplanted pax5-deficient pre-b i-cell clones. *Blood* **2002**, *99*, 472–478. [[CrossRef](#)]
155. Hoflinger, S.; Kesavan, K.; Fuxa, M.; Hutter, C.; Heavey, B.; Radtke, F.; Busslinger, M. Analysis of notch1 function by in vitro t cell differentiation of pax5 mutant lymphoid progenitors. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 3935–3944. [[CrossRef](#)]
156. Delogu, A.; Schebesta, A.; Sun, Q.; Aschenbrenner, K.; Perlot, T.; Busslinger, M. Gene repression by pax5 in b cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* **2006**, *24*, 269–281. [[CrossRef](#)]
157. Schebesta, A.; McManus, S.; Salvagiotto, G.; Delogu, A.; Busslinger, G.A.; Busslinger, M. Transcription factor pax5 activates the chromatin of key genes involved in b cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity* **2007**, *27*, 49–63. [[CrossRef](#)]
158. Revilla, I.D.R.; Bilic, I.; Vilagos, B.; Tagoh, H.; Ebert, A.; Tamir, L.M.; Smeenk, L.; Trupke, J.; Sommer, A.; Jaritz, M.; et al. The b-cell identity factor pax5 regulates distinct transcriptional programmes in early and late b lymphopoiesis. *EMBO J.* **2012**, *31*, 3130–3146. [[CrossRef](#)]
159. Cobaleda, C.; Jochum, W.; Busslinger, M. Conversion of mature b cells into t cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* **2007**, *449*, 473–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Nebral, K.; Denk, D.; Attarbaschi, A.; Konig, M.; Mann, G.; Haas, O.A.; Strehl, S. Incidence and diversity of pax5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2009**, *23*, 134–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Familiades, J.; Bousquet, M.; Lafage-Pochitaloff, M.; Bene, M.C.; Beldjord, K.; De Vos, J.; Dastugue, N.; Coyaude, E.; Struski, S.; Quelen, C.; et al. Pax5 mutations occur frequently in adult b-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and pax5 haploinsufficiency is associated with bcr-abl1 and tcf3-pbx1 fusion genes: A graall study. *Leukemia* **2009**, *23*, 1989–1998. [[CrossRef](#)]
162. Mullighan, C.G.; Goorha, S.; Radtke, I.; Miller, C.B.; Coustan-Smith, E.; Dalton, J.D.; Girtman, K.; Mathew, S.; Ma, J.; Pounds, S.B.; et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **2007**, *446*, 758–764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Cobaleda, C.; Schebesta, A.; Delogu, A.; Busslinger, M. Pax5: The guardian of b cell identity and function. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 463–470. [[CrossRef](#)]
164. Dang, J.; Wei, L.; de Ridder, J.; Su, X.; Rust, A.G.; Roberts, K.G.; Payne-Turner, D.; Cheng, J.; Ma, J.; Qu, C.; et al. Pax5 is a tumor suppressor in mouse mutagenesis models of acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2015**, *125*, 3609–3617. [[CrossRef](#)]
165. Ramamoorthy, S.; Kometani, K.; Herman, J.S.; Bayer, M.; Boller, S.; Edwards-Hicks, J.; Ramachandran, H.; Li, R.; Klein-Geltink, R.; Pearce, E.L.; et al. Ebf1 and pax5 safeguard leukemic transformation by limiting il-7 signaling, myc expression, and folate metabolism. *Genes Dev.* **2020**, *34*, 1503–1519. [[CrossRef](#)]
166. Prasad, M.A.; Ungerback, J.; Ahsberg, J.; Somasundaram, R.; Strid, T.; Larsson, M.; Mansson, R.; De Paepe, A.; Lilljebjorn, H.; Fioretos, T.; et al. Ebf1 heterozygosity results in increased DNA damage in pro-b cells and their synergistic transformation by pax5 haploinsufficiency. *Blood* **2015**, *125*, 4052–4059. [[CrossRef](#)]
167. Chan, L.N.; Chen, Z.; Braas, D.; Lee, J.W.; Xiao, G.; Geng, H.; Cosgun, K.N.; Hurtz, C.; Shojaaee, S.; Cazzaniga, V.; et al. Metabolic gatekeeper function of b-lymphoid transcription factors. *Nature* **2017**, *542*, 479–483. [[CrossRef](#)]
168. Heltemes-Harris, L.M.; Willette, M.J.; Ramsey, L.B.; Qiu, Y.H.; Neeley, E.S.; Zhang, N.; Thomas, D.A.; Koeuth, T.; Baechler, E.C.; Kornblau, S.M.; et al. Ebf1 or pax5 haploinsufficiency synergizes with stat5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 1135–1149. [[CrossRef](#)]
169. Roberts, K.G.; Mullighan, C.G. The biology of b-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2020**, *10*, a034835. [[CrossRef](#)]
170. Somasundaram, R.; Prasad, M.A.; Ungerback, J.; Sigvardsson, M. Transcription factor networks in b-cell differentiation link development to acute lymphoid leukemia. *Blood* **2015**, *126*, 144–152. [[CrossRef](#)]
171. Ungerback, J.; Ahsberg, J.; Strid, T.; Somasundaram, R.; Sigvardsson, M. Combined heterozygous loss of ebf1 and pax5 allows for t-lineage conversion of b cell progenitors. *J. Exp. Med.* **2015**, *212*, 1109–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

172. Hu, Y.; Zhang, Z.; Kashiwagi, M.; Yoshida, T.; Joshi, I.; Jena, N.; Somasundaram, R.; Emmanuel, A.O.; Sigvardsson, M.; Fitamant, J.; et al. Superenhancer reprogramming drives a b-cell-epithelial transition and high-risk leukemia. *Genes Dev.* **2016**, *30*, 1971–1990. [\[CrossRef\]](#)
173. Rodriguez-Hernandez, G.; Opitz, F.V.; Delgado, P.; Walter, C.; Alvarez-Prado, A.F.; Gonzalez-Herrero, I.; Auer, F.; Fischer, U.; Janssen, S.; Bartenhagen, C.; et al. Infectious stimuli promote malignant b-cell acute lymphoblastic leukemia in the absence of aid. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5563. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
174. Martin-Lorenzo, A.; Hauer, J.; Vicente-Duenas, C.; Auer, F.; Gonzalez-Herrero, I.; Garcia-Ramirez, I.; Ginzel, S.; Thiele, R.; Constantinescu, S.N.; Bartenhagen, C.; et al. Infection exposure is a causal factor in b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia as a result of pax5-inherited susceptibility. *Cancer Discov.* **2015**, *5*, 1328–1343. [\[CrossRef\]](#)
175. Vicente-Duenas, C.; Janssen, S.; Oldenburg, M.; Auer, F.; Gonzalez-Herrero, I.; Casado-Garcia, A.; Isidro-Hernandez, M.; Raboso-Gallego, J.; Westhoff, P.; Pandya, A.A.; et al. An intact gut microbiome protects genetically predisposed mice against leukemia. *Blood* **2020**, *136*, 2003–2017. [\[CrossRef\]](#)
176. Isidro-Hernandez, M.; Mayado, A.; Casado-Garcia, A.; Martinez-Cano, J.; Palmi, C.; Fazio, G.; Orfao, A.; Ribera, J.; Ribera, J.M.; Zamora, L.; et al. Inhibition of inflammatory signaling in pax5 mutant cells mitigates b-cell leukemogenesis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 19189. [\[CrossRef\]](#)
177. Cobaleda, C.; Vicente-Duenas, C.; Sanchez-Garcia, I. Infectious triggers and novel therapeutic opportunities in childhood b cell leukaemia. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 570–581. [\[CrossRef\]](#)
178. Medvedovic, J.; Ebert, A.; Tagoh, H.; Busslinger, M. Pax5: A master regulator of b cell development and leukemogenesis. *Adv. Immunol.* **2011**, *111*, 179–206.
179. Bousquet, M.; Broccardo, C.; Quelen, C.; Meggetto, F.; Kuhlein, E.; Delsol, G.; Dastugue, N.; Brousset, P. A novel pax5-eln fusion protein identified in b-cell acute lymphoblastic leukemia acts as a dominant negative on wild-type pax5. *Blood* **2007**, *109*, 3417–3423. [\[CrossRef\]](#)
180. Coyaud, E.; Struski, S.; Prade, N.; Familiades, J.; Eichner, R.; Quelen, C.; Bousquet, M.; Mugneret, F.; Talmant, P.; Pages, M.P.; et al. Wide diversity of pax5 alterations in b-all: A groupe francophone de cytogenetique hematologique study. *Blood* **2010**, *115*, 3089–3097. [\[CrossRef\]](#)
181. Marincevic-Zuniga, Y.; Zachariadis, V.; Cavelier, L.; Castor, A.; Barbany, G.; Forestier, E.; Fogelstrand, L.; Heyman, M.; Abrahamson, J.; Lönnerholm, G.; et al. PAX5-ESRRB is a recurrent fusion gene in B-cell precursor pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **2015**, *101*, e20–e23. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
182. Cazzaniga, G.; Daniotti, M.; Tosi, S.; Giudici, G.; Aloisi, A.; Pogliani, E.; Kearney, L.; Biondi, A. The paired box domain gene pax5 is fused to etv6/tel in an acute lymphoblastic leukemia case. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4666–4670. [\[PubMed\]](#)
183. Smeenk, L.; Fischer, M.; Jurado, S.; Jaritz, M.; Azaryan, A.; Werner, B.; Roth, M.; Zuber, J.; Stanulla, M.; den Boer, M.L.; et al. Molecular role of the pax5-etv6 oncoprotein in promoting b-cell acute lymphoblastic leukemia. *EMBO J.* **2017**, *36*, 718–735. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
184. Jamrog, L.; Chemin, G.; Fregona, V.; Coster, L.; Pasquet, M.; Oudinet, C.; Rouquie, N.; Prade, N.; Lagarde, S.; Cresson, C.; et al. Pax5-eln oncoprotein promotes multistep b-cell acute lymphoblastic leukemia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 10357–10362. [\[CrossRef\]](#)
185. Van der Weyden, L.; Giotopoulos, G.; Wong, K.; Rust, A.G.; Robles-Espinoza, C.D.; Osaki, H.; Huntly, B.J.; Adams, D.J. Somatic drivers of b-all in a model of etv6-runx1; pax5(+/-) leukemia. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 585. [\[CrossRef\]](#)
186. Duque-Afonso, J.; Feng, J.; Scherer, F.; Lin, C.H.; Wong, S.H.; Wang, Z.; Iwasaki, M.; Cleary, M.L. Comparative genomics reveals multistep pathogenesis of e2a-pbx1 acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 3667–3680. [\[CrossRef\]](#)
187. Shah, S.; Schrader, K.A.; Waanders, E.; Timms, A.E.; Vijai, J.; Miething, C.; Wechsler, J.; Yang, J.; Hayes, J.; Klein, R.J.; et al. A recurrent germline pax5 mutation confers susceptibility to pre-b cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1226–1231. [\[CrossRef\]](#)
188. Duployez, N.; Jamrog, L.A.; Fregona, V.; Hamelle, C.; Fenwarth, L.; Lejeune, S.; Helevaut, N.; Geffroy, S.; Caillault, A.; Marceau-Renaut, A.; et al. Germline pax5 mutation predisposes to familial b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2021**, *137*, 1424–1428. [\[CrossRef\]](#)
189. An, Q.; Wright, S.L.; Konn, Z.J.; Matheson, E.; Minto, L.; Moorman, A.V.; Parker, H.; Griffiths, M.; Ross, F.M.; Davies, T.; et al. Variable breakpoints target pax5 in patients with dicentric chromosomes: A model for the basis of unbalanced translocations in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17050–17054. [\[CrossRef\]](#)
190. Gu, Z.; Churchman, M.L.; Roberts, K.G.; Moore, I.; Zhou, X.; Nakitandwe, J.; Hagiwara, K.; Pelletier, S.; Gingras, S.; Berns, H.; et al. Pax5-driven subtypes of b-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 296–307. [\[CrossRef\]](#)
191. Passet, M.; Boissel, N.; Sigaux, F.; Saillard, C.; Bargetzi, M.; Ba, L.; Thomas, X.; Graux, C.; Chalandon, Y.; Leguay, T.; et al. Pax5 p80r mutation identifies a novel subtype of b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with favorable outcome. *Blood* **2019**, *133*, 280–284. [\[CrossRef\]](#)
192. Li, J.F.; Dai, Y.T.; Lilljebjorn, H.; Shen, S.H.; Cui, B.W.; Bai, L.; Liu, Y.F.; Qian, M.X.; Kubota, Y.; Kiyoi, H.; et al. Transcriptional landscape of b cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E11711–E11720. [\[CrossRef\]](#)



193. Bastian, L.; Schroeder, M.P.; Eckert, C.; Schlee, C.; Tanchez, J.O.; Kampf, S.; Wagner, D.L.; Schulze, V.; Isaakidis, K.; Lazaro-Navarro, J.; et al. Pax5 biallelic genomic alterations define a novel subgroup of b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2019**, *33*, 1895–1909. [CrossRef]
194. Aplan, P.D.; Jones, C.A.; Chervinsky, D.S.; Zhao, X.; Ellsworth, M.; Wu, C.; McGuire, E.A.; Gross, K.W. An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with lmo1 to generate t-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J.* **1997**, *16*, 2408–2419. [CrossRef]
195. Curtis, D.J.; Robb, L.; Strasser, A.; Begley, C.G. The cd2-scl transgene alters the phenotype and frequency of t-lymphomas in n-ras transgenic or p53 deficient mice. *Oncogene* **1997**, *15*, 2975–2983. [CrossRef]
196. Goardon, N.; Schuh, A.; Hajar, L.; Ma, X.; Jouault, H.; Dzierzak, E.; Romeo, P.H.; Maouche-Chretien, L. Ectopic expression of tal-1 protein in ly-6e.1-htal-1 transgenic mice induces defects in b- and t-lymphoid differentiation. *Blood* **2002**, *100*, 491–500. [CrossRef]
197. Condorelli, G.L.; Facchiano, F.; Valtieri, M.; Proietti, E.; Vitelli, L.; Lulli, V.; Huebner, K.; Peschle, C.; Croce, C.M. T-cell-directed tal-1 expression induces t-cell malignancies in transgenic mice. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 5113–5119.
198. Kelliher, M.A.; Seldin, D.C.; Leder, P. Tal-1 induces t cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase iialpha. *EMBO J.* **1996**, *15*, 5160–5166. [CrossRef]
199. Draheim, K.M.; Hermance, N.; Yang, Y.; Arous, E.; Calvo, J.; Kelliher, M.A. A DNA-binding mutant of tal1 cooperates with lmo2 to cause t cell leukemia in mice. *Oncogene* **2011**, *30*, 1252–1260. [CrossRef]
200. Tremblay, C.S.; Brown, F.C.; Collett, M.; Saw, J.; Chiu, S.K.; Sonderegger, S.E.; Lucas, S.E.; Alserihi, R.; Chau, N.; Toribio, M.L.; et al. Loss-of-function mutations of dynamin 2 promote t-all by enhancing il-7 signalling. *Leukemia* **2016**, *30*, 1993–2001. [CrossRef]
201. Shields, B.J.; Alserihi, R.; Nasa, C.; Bogue, C.; Alexander, W.S.; McCormack, M.P. Hhex regulates kit to promote radioresistance of self-renewing thymocytes in lmo2-transgenic mice. *Leukemia* **2015**, *29*, 927–938. [CrossRef]
202. Choi, C.W.; Chung, Y.J.; Slape, C.; Aplan, P.D. A nup98-hoxd13 fusion gene impairs differentiation of b and t lymphocytes and leads to expansion of thymocytes with partial tcrb gene rearrangement. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 6227–6235. [CrossRef]
203. Nutt, S.L.; Vambrie, S.; Steinlein, P.; Kozmik, Z.; Rolink, A.; Weith, A.; Busslinger, M. Independent regulation of the two pax5 alleles during b-cell development. *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 390–395. [CrossRef]
204. Heltemes-Harris, L.M.; Hubbard, G.K.; La Rue, R.S.; Munro, S.A.; Knudson, T.P.; Yang, R.; Henzler, C.M.; Starr, T.K.; Sarver, A.L.; Kornblau, M.S.; et al. Identification of mutations that cooperate with defects in B cell transcription factors to initiate leukemia. *bioRxiv* **2020**. [CrossRef]
205. Boast, B.; Helian, K.; Andrews, T.D.; Vicky Cho, X.L.; Closa, A.; Sutton, H.J.; Reed, J.H.; Bergmann, H.; Roots, C.M.; Yabas, M.; et al. Dysregulation of PAX5 causes uncommitted B cell development and tumorigenesis in mice. *bioRxiv* **2021**. [CrossRef]
206. Rodriguez-Hernandez, G.; Hauer, J.; Martin-Lorenzo, A.; Schafer, D.; Bartenhagen, C.; Garcia-Ramirez, I.; Auer, F.; Gonzalez-Herrero, I.; Ruiz-Roca, L.; Gombert, M.; et al. Infection exposure promotes etv6-runx1 precursor b-cell leukemia via impaired h3k4 demethylases. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 4365–4377. [CrossRef]
207. Bijl, J.; Sauvageau, M.; Thompson, A.; Sauvageau, G. High incidence of proviral integrations in the Hoxa locus in a new model of E2a-PBX1-induced B-cell leukemia. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 224–233. [CrossRef]
208. Martin-Lorenzo, A.; Auer, F.; Chan, L.N.; Garcia-Ramirez, I.; Gonzalez-Herrero, I.; Rodriguez-Hernandez, G.; Bartenhagen, C.; Dugas, M.; Gombert, M.; Ginzler, S.; et al. Loss of pax5 exploits sca1-bcr-abl(p190) susceptibility to confer the metabolic shift essential for pb-all. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 2669–2679. [CrossRef]
209. Hopkins, A.L.; Groom, C.R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727–730. [CrossRef]
210. Verdine, G.L.; Walensky, L.D. The challenge of drugging undruggable targets in cancer: Lessons learned from targeting bcl-2 family members. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 7264–7270. [CrossRef]
211. Nasr, R.; Guillemain, M.C.; Ferhi, O.; Soilihi, H.; Peres, L.; Berthier, C.; Rousselot, P.; Robledo-Sarmiento, M.; Lallemand-Breitenbach, V.; Gourmel, B.; et al. Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through pml-rara degradation. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1333–1342. [CrossRef] [PubMed]
212. De The, H.; Pandolfi, P.P.; Chen, Z. Acute promyelocytic leukemia: A paradigm for oncoprotein-targeted cure. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 552–560. [CrossRef] [PubMed]
213. Conneely, S.E.; Stevens, A.M. Advances in pediatric acute promyelocytic leukemia. *Children* **2020**, *7*, 11. [CrossRef] [PubMed]
214. Benyoucef, A.; Pali, C.G.; Wang, C.; Porter, C.J.; Chu, A.; Dai, F.; Tremblay, V.; Rakopoulos, P.; Singh, K.; Huang, S.; et al. Utx inhibition as selective epigenetic therapy against tal1-driven t-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev.* **2016**, *30*, 508–521. [CrossRef]
215. McMillin, D.W.; Delmore, J.; Weisberg, E.; Negri, J.M.; Geer, D.C.; Klippel, S.; Mitsiades, N.; Schlossman, R.L.; Munshi, N.C.; Kung, A.L.; et al. Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 483–489. [CrossRef]
216. Tabe, Y.; Konopleva, M. Role of microenvironment in resistance to therapy in aml. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **2015**, *10*, 96–103. [CrossRef]
217. Lane, S.W.; Scadden, D.T.; Gilliland, D.G. The leukemic stem cell niche: Current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* **2009**, *114*, 1150–1157. [CrossRef]
218. Batsivari, A.; Haltalli, M.L.R.; Passaro, D.; Pospori, C.; Celso, C.L.; Bonnet, D. Dynamic responses of the haematopoietic stem cell niche to diverse stresses. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *22*, 7–17. [CrossRef]

219. Medyouf, H. The microenvironment in human myeloid malignancies: Emerging concepts and therapeutic implications. *Blood* **2017**, *129*, 1617–1626. [[CrossRef](#)]
220. Xia, B.; Tian, C.; Guo, S.; Zhang, L.; Zhao, D.; Qu, F.; Zhao, W.; Wang, Y.; Wu, X.; Da, W.; et al. C-myc plays part in drug resistance mediated by bone marrow stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **2015**, *39*, 92–99. [[CrossRef](#)]
221. Sanchez-Aguilera, A.; Mendez-Ferrer, S. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 579–590. [[CrossRef](#)]
222. Passaro, D.; Quang, C.T.; Ghysdael, J. Microenvironmental cues for t-cell acute lymphoblastic leukemia development. *Immunol. Rev.* **2016**, *271*, 156–172. [[CrossRef](#)]
223. Calvo, J.; Fahy, L.; Uzan, B.; Pflumio, F. Desperately seeking a home marrow niche for t-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Adv. Biol. Regul.* **2019**, *74*, 100640. [[CrossRef](#)]
224. Delahaye, M.C.; Salem, K.I.; Pelletier, J.; Aurrand-Lions, M.; Mancini, S.J.C. Toward therapeutic targeting of bone marrow leukemic niche protective signals in b-cell acute lymphoblastic leukemia. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 606540. [[CrossRef](#)]
225. Burt, R.; Dey, A.; Aref, S.; Aguiar, M.; Akarca, A.; Bailey, K.; Day, W.; Hooper, S.; Kirkwood, A.; Kirschner, K.; et al. Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. *Blood* **2019**, *134*, 1415–1429. [[CrossRef](#)]
226. De Smedt, R.; Morscio, J.; Reunes, L.; Roels, J.; Bardelli, V.; Lintermans, B.; van Looche, W.; Almeida, A.; Cheung, L.C.; Kotecha, R.S.; et al. Targeting cytokine- and therapy-induced pim1 activation in preclinical models of t-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Blood* **2020**, *135*, 1685–1695. [[CrossRef](#)]
227. Gerby, B.; Hoang, T. A targetable cue in t-cell malignancy. *Blood* **2020**, *135*, 1616–1617. [[CrossRef](#)]
228. Ma, C.; Witkowski, M.T.; Harris, J.; Dolgalev, I.; Sreeram, S.; Qian, W.; Tong, J.; Chen, X.; Aifantis, I.; Chen, W. Leukemia-on-a-chip: Dissecting the chemoresistance mechanisms in b cell acute lymphoblastic leukemia bone marrow niche. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaba5536. [[CrossRef](#)]
229. Tremblay, C.S.; Chiu, S.K.; Saw, J.; McCalmont, H.; Litalien, V.; Boyle, J.; Sonderegger, S.E.; Chau, N.; Evans, K.; Cerruti, L.; et al. Small molecule inhibition of dynamin-dependent endocytosis targets multiple niche signals and impairs leukemia stem cells. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 6211. [[CrossRef](#)]
230. Chattopadhyay, S.; Stewart, A.L.; Mukherjee, S.; Huang, C.; Hartwell, K.A.; Miller, P.G.; Subramanian, R.; Carmody, L.C.; Yusuf, R.Z.; Sykes, D.B.; et al. Niche-based screening in multiple myeloma identifies a kinesin-5 inhibitor with improved selectivity over hematopoietic progenitors. *Cell Rep.* **2015**, *10*, 755–770. [[CrossRef](#)]
231. Hartwell, K.A.; Miller, P.G.; Mukherjee, S.; Kahn, A.R.; Stewart, A.L.; Logan, D.J.; Negri, J.M.; Duvet, M.; Jaras, M.; Puram, R.; et al. Niche-based screening identifies small-molecule inhibitors of leukemia stem cells. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 840–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
232. Weng, A.P.; Millholland, J.M.; Yashiro-Ohtani, Y.; Arcangeli, M.L.; Lau, A.; Wai, C.; Del Bianco, C.; Rodriguez, C.G.; Sai, H.; Tobias, J.; et al. C-myc is an important direct target of notch1 in t-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 2096–2109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Palomero, T.; Lim, W.K.; Odom, D.T.; Sulis, M.L.; Real, P.J.; Margolin, A.; Barnes, K.C.; O’Neil, J.; Neuberg, D.; Weng, A.P.; et al. Notch1 directly regulates c-myc and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18261–18266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. Roderick, J.E.; Tesell, J.; Shultz, L.D.; Brehm, M.A.; Greiner, D.L.; Harris, M.H.; Silverman, L.B.; Sallan, S.E.; Gutierrez, A.; Look, A.T.; et al. C-myc inhibition prevents leukemia initiation in mice and impairs the growth of relapsed and induction failure pediatric t-all cells. *Blood* **2014**, *123*, 1040–1050. [[CrossRef](#)]
235. Yashiro-Ohtani, Y.; Wang, H.; Zang, C.; Arnett, K.L.; Bailis, W.; Ho, Y.; Knoechel, B.; Lanauze, C.; Louis, L.; Forsyth, K.S.; et al. Long-range enhancer activity determines myc sensitivity to notch inhibitors in t cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E4946–E4953. [[CrossRef](#)]
236. Jin, G.; Wong, S.T. Toward better drug repositioning: Prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 637–644. [[CrossRef](#)]

## Bibliographie

- Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S & Belmonte JCI (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26, 1276–1284.
- Adelman ER, Huang H-T, Roisman A, Olsson A, Colaprico A, Qin T, Lindsley RC, Bejar R, Salomonis N, Grimes HL & Figueroa ME (2019) Aging Human Hematopoietic Stem Cells Manifest Profound Epigenetic Reprogramming of Enhancers That May Predispose to Leukemia. *Cancer Discovery* 9, 1080–1101.
- Ahmad K, Katryniok C, Scholz B, Merkens J, Löscher D, Marschalek R & Steinhilber D (2014) Inhibition of class I HDACs abrogates the dominant effect of MLL-AF4 by activation of wild-type MLL. *Oncogenesis* 3, e127–e127.
- Aiba Y, Kameyama M, Yamazaki T, Tedder TF & Kurosaki T (2008) Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 111, 1497–1503.
- Alberti-Servera L, von Muenchow L, Tsapogas P, Capoferri G, Eschbach K, Beisel C, Ceredig R, Ivanek R & Rolink A (2017) Single-cell RNA sequencing reveals developmental heterogeneity among early lymphoid progenitors. *EMBO J* 36, 3619–3633.
- Alexander TB, Gu Z, Iacobucci I, Dickerson K, Choi JK, Xu B, Payne-Turner D, Yoshihara H, Loh ML, Horan J, Buldini B, Basso G, Elitzur S, de Haas V, Zwaan CM, Yeoh A, Reinhardt D, Tomizawa D, Kiyokawa N, Lammens T, De Moerloose B, Catchpoole D, Hori H, Moorman A, Moore AS, Hrusak O, Meshinchi S, Orgel E, Devidas M, Borowitz M, Wood B, Heerema NA, Carrol A, Yang Y-L, Smith MA, Davidsen TM, Hermida LC, Gesuwan P, Marra MA, Ma Y, Mungall AJ, Moore RA, Jones SJM, Valentine M, Janke LJ, Rubnitz JE, Pui C-H, Ding L, Liu Y, Zhang J, Nichols KE, Downing JR, Cao X, Shi L, Pounds S, Newman S, Pei D, Guidry Auvil JM, Gerhard DS, Hunger SP, Inaba H & Mullighan CG (2018) The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature* 562, 373–379.
- Althoff MJ, Nayak RC, Hegde S, Wellendorf AM, Bohan B, Filippi M-D, Xin M, Lu QR, Geiger H, Zheng Y, Diaz-Meco MT, Moscat J & Cancelas JA (2020) Yap1-Scribble polarization is required for hematopoietic stem cell division and fate. *Blood* 136, 1824–1836.
- Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, Kempinski H, Moorman AV, Tittley I, Swansbury J, Kearney L, Enver T & Greaves M (2011) Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 469, 356–361.
- Antony-Debré I, Paul A, Leite J, Mitchell K, Kim HM, Carvajal LA, Todorova TI, Huang K, Kumar A, Farahat AA, Bartholdy B, Narayanagari S-R, Chen J, Ambesi-Impiombato A, Ferrando AA, Mantzaris I, Gavathiotis E, Verma A, Will B, Boykin DW, Wilson WD, Poon GM & Steidl U (2017) Pharmacological inhibition of the transcription factor PU.1 in leukemia. *J Clin Invest* 127, 4297–4313.

- Arai F & Suda T (2007) Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann N Y Acad Sci* 1106, 41–53.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M & Vardiman JW (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391–2405.
- Arinobu Y, Mizuno S, Chong Y, Shigematsu H, Iino T, Iwasaki H, Graf T, Mayfield R, Chan S, Kastner P & Akashi K (2007) Reciprocal Activation of GATA-1 and PU.1 Marks Initial Specification of Hematopoietic Stem Cells into Myeloerythroid and Myelolymphoid Lineages. *Cell Stem Cell* 1, 416–427.
- Asada S, Daitoku H, Matsuzaki H, Saito T, Sudo T, Mukai H, Iwashita S, Kako K, Kishi T, Kasuya Y & Fukamizu A (2007) Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cell Signal* 19, 519–527.
- Azzoni E, Frontera V, McGrath KE, Harman J, Carrelha J, Nerlov C, Palis J, Jacobsen SEW & de Bruijn MF (2018) Kit ligand has a critical role in mouse yolk sac and aorta–gonad–mesonephros hematopoiesis. *EMBO reports* 19, e45477.
- Baba Y & Kurosaki T (2016) Role of Calcium Signaling in B Cell Activation and Biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 393, 143–174.
- Baccin C, Al-Sabah J, Velten L, Helbling PM, Grünschläger F, Hernández-Malmierca P, Nombela-Arrieta C, Steinmetz LM, Trumpp A & Haas S (2020) Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nat Cell Biol* 22, 38–48.
- Baek J, Lopez PA, Lee S, Kim T-S, Kumar S & Schaffer DV (2022) Egr1 is a 3D matrix–specific mediator of mechanosensitive stem cell lineage commitment. *Science Advances* 8, eabm4646.
- Bahr C, von Paleske L, Uslu VV, Remeseiro S, Takayama N, Ng SW, Murison A, Langenfeld K, Petretich M, Scognamiglio R, Zeisberger P, Benk AS, Amit I, Zandstra PW, Lupien M, Dick JE, Trumpp A & Spitz F (2018) A Myc enhancer cluster regulates normal and leukaemic haematopoietic stem cell hierarchies. *Nature* 553, 515–520.
- Balounová J, Šplíchalová I, Dobešová M, Kolář M, Fišer K, Procházka J, Sedlacek R, Jurisicova A, Sung H, Kořínek V, Alberich-Jorda M, Godin I & Filipp D (2019) Toll-like receptor 2 expression on c-kit+ cells tracks the emergence of embryonic definitive hematopoietic progenitors. *Nat Commun* 10, 5176.
- Balzano M, De Grandis M, Vu Manh T-P, Chasson L, Bardin F, Farina A, Sergé A, Bidaut G, Charbord P, Hérault L, Bailly A-L, Cartier-Michaud A, Boned A, Dalod M, Duprez E, Genever P, Coles M, Bajenoff M, Xerri L, Aurrand-Lions M, Schiff C & Mancini SJC (2019) Nidogen-1 Contributes to the Interaction Network Involved in Pro-B Cell Retention in the Peri-sinusoidal Hematopoietic Stem Cell Niche. *Cell Reports* 26, 3257–3271.e8.
- Bankovich AJ, Raunser S, Juo ZS, Walz T, Davis MM & Garcia KC (2007) Structural insight into pre-B cell receptor function. *Science* 316, 291.

- Barker JE (1994) SI/Sld hematopoietic progenitors are deficient in situ. *Exp Hematol* 22, 174–177.
- Barlev NA, Emelyanov AV, Castagnino P, Zegerman P, Bannister AJ, Sepulveda MA, Robert F, Tora L, Kouzarides T, Birshstein BK & Berger SL (2003) A novel human Ada2 homologue functions with Gcn5 or Brg1 to coactivate transcription. *Mol Cell Biol* 23, 6944–6957.
- Barnett BE, Ciocca ML, Goenka R, Barnett LG, Wu J, Laufer TM, Burkhardt JK, Cancro MP & Reiner SL (2012) Asymmetric B cell division in the germinal center reaction. *Science* 335, 342–344.
- Barrena S, Almeida J, Yunta M, López A, Fernández-Mosteirín N, Giralt M, Romero M, Perdiguer L, Delgado M, Orfao A & Lazo PA (2005) Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation. *Leukemia* 19, 1376–1383.
- Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM & Peault B (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2804–2808.
- Beavis Paul A, Stagg J, Darcy PK & Smyth MJ (2012) CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in Immunology* 33, 231–237.
- Beck T, Cordeiro Gomes A, Cyster J & Pereira J (2014) CXCR4 and a cell-extrinsic mechanism control immature B lymphocyte egress from bone marrow. *Journal of Experimental Medicine* 211, 2567–2581.
- Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, Sigvardsson M, Weissman I, Bryder D & Rossi D (2010) Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 5465–70.
- Belluschi S, Calderbank EF, Ciaurro V, Pijuan-Sala B, Santoro A, Mende N, Diamanti E, Sham KYC, Wang X, Lau WWY, Jawaid W, Göttgens B & Laurenti E (2018) Myeloid lineage restriction occurs in the human haematopoietic stem cell compartment before lymphoid-primed multipotent progenitors. *Nat Commun* 9, 4100.
- Bendall SC, Davis KL, Amir ED, Tadmor MD, Simonds EF, Chen TJ, Shenfeld DK, Nolan GP & Pe'er D (2014) Single-Cell Trajectory Detection Uncovers Progression and Regulatory Coordination in Human B Cell Development. *Cell* 157, 714–725.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A & van't Veer MB (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9, 1783–1786.
- Berkahn L & Keating A (2004) Hematopoiesis in the Elderly. *Hematology* 9, 159–163.
- Bernitz JM, Kim HS, MacArthur B, Sieburg H & Moore K (2016) Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions. *Cell* 167, 1296–1309.e10.

- Bernt KM, Zhu N, Sinha AU, Vempati S, Faber J, Krivtsov AV, Feng Z, Punt N, Daigle A, Bullinger L, Pollock RM, Richon VM, Kung AL & Armstrong SA (2011) MLL-Rearranged Leukemia Is Dependent on Aberrant H3K79 Methylation by DOT1L. *Cancer Cell* 20, 66–78.
- Bleakley M & Riddell SR (2004) Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 4, 371–380.
- Bogeska R, Mikecin A-M, Kaschutnig P, Fawaz M, Büchler-Schäff M, Le D, Ganuza M, Vollmer A, Paffenholz SV, Asada N, Rodriguez-Correa E, Frauhammer F, Buettner F, Ball M, Knoch J, Stäble S, Walter D, Petri A, Carreño-Gonzalez MJ, Wagner V, Brors B, Haas S, Lipka DB, Essers MAG, Weru V, Holland-Letz T, Mallm J-P, Rippe K, Krämer S, Schlesner M, McKinney Freeman S, Florian MC, King KY, Frenette PS, Rieger MA & Milsom MD (2022) Inflammatory exposure drives long-lived impairment of hematopoietic stem cell self-renewal activity and accelerated aging. *Cell Stem Cell* 29, 1273-1284.e8.
- Böiers C, Richardson SE, Laycock E, Zriwil A, Turati VA, Brown J, Wray JP, Wang D, James C, Herrero J, Sitnicka E, Karlsson S, Smith AJH, Jacobsen SEW & Enver T (2018) A Human IPS Model Implicates Embryonic B-Myeloid Fate Restriction as Developmental Susceptibility to B Acute Lymphoblastic Leukemia-Associated ETV6-RUNX1. *Developmental Cell* 44, 362-377.e7.
- Boisset J-C, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E & Robin C (2010) In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 464, 116–120.
- Bonnet D & Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730–737.
- Bonzi J, Bornet O, Betzi S, Kasper BT, Mahal LK, Mancini SJ, Schiff C, Sebban-Kreuzer C, Guerlesquin F & Elantak L (2015) Pre-B cell receptor binding to galectin-1 modifies galectin-1/carbohydrate affinity to modulate specific galectin-1/glycan lattice interactions. *Nat Commun* 6, 6194.
- Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, Linda S, Martin PL, Pullen DJ, Viswanatha D, Willman CL, Winick N, Camitta BM, & Children’s Oncology Group (2008) Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children’s Oncology Group study. *Blood* 111, 5477–5485.
- Borsa M, Barandun N, Gräbnitz F, Barnstorf I, Baumann NS, Pallmer K, Baumann S, Stark D, Balaz M, Oetiker N, Wagen F, Wolfrum C, Simon AK, Joller N, Barral Y, Spörri R & Oxenius A (2021) Asymmetric cell division shapes naive and virtual memory T-cell immunity during ageing. *Nat Commun* 12, 2715.
- Bousquet M, Broccardo C, Quelen C, Meggetto F, Kuhlein E, Delsol G, Dastugue N & Brousset P (2007) A novel PAX5-ELN fusion protein identified in B-cell acute lymphoblastic leukemia acts as a dominant negative on wild-type PAX5. *Blood* 109, 3417–3423.
- Brady SW, Roberts KG, Gu Z, Shi L, Pounds S, Pei D, Cheng C, Dai Y, Devidas M, Qu C, Hill AN, Payne-Turner D, Ma X, Iacobucci I, Baviskar P, Wei L, Arunachalam S, Hagiwara

- K, Liu Y, Flasch DA, Liu Y, Parker M, Chen X, Elsayed AH, Pathak O, Li Y, Fan Y, Michael JR, Rusch M, Wilkinson MR, Foy S, Hedges DJ, Newman S, Zhou X, Wang J, Reilly C, Sioson E, Rice SV, Pastor Loyola V, Wu G, Rampersaud E, Reshmi SC, Gastier-Foster J, Guidry Auvil JM, Gesuwan P, Smith MA, Winick N, Carroll AJ, Heerema NA, Harvey RC, Willman CL, Larsen E, Raetz EA, Borowitz MJ, Wood BL, Carroll WL, Zweidler-McKay PA, Rabin KR, Mattano LA, Maloney KW, Winter SS, Burke MJ, Salzer W, Dunsmore KP, Angiolillo AL, Crews KR, Downing JR, Jeha S, Pui C-H, Evans WE, Yang JJ, Relling MV, Gerhard DS, Loh ML, Hunger SP, Zhang J & Mullighan CG (2022) The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 54, 1376–1389.
- Britten O, Ragusa D, Tosi S & Mostafa Kamel Y (2019) MLL-Rearranged Acute Leukemia with t(4;11)(q21;q23)-Current Treatment Options. Is There a Role for CAR-T Cell Therapy? *Cells* 8.
- Burchill MA, Goetz CA, Prlic M, O’Neil JJ, Harmon IR, Bensinger SJ, Turka LA, Brennan P, Jameson SC & Farrar MA (2003) Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells. *J Immunol* 171, 5853–5864.
- Burmeister T, Meyer C, Schwartz S, Hofmann J, Molkentin M, Kowarz E, Schneider B, Raff T, Reinhardt R, Gökbüget N, Hoelzer D, Thiel E & Marschalek R (2009) The MLL recombinome of adult CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results from the GMALL study group. *Blood* 113, 4011–4015.
- Burns CE, Traver D, Mayhall E, Shepard JL & Zon LI (2005) Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev* 19, 2331–2342.
- Busch K, Klapproth K, Barile M, Flossdorf M, Holland-Letz T, Schlenner SM, Reth M, Höfer T & Rodewald H-R (2015) Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo. *Nature* 518, 542–546.
- Cabezas-Wallscheid N, Buettner F, Sommerkamp P, Klimmeck D, Ladel L, Thalheimer FB, Pastor-Flores D, Roma LP, Renders S, Zeisberger P, Przybylla A, Schönberger K, Scognamiglio R, Altamura S, Florian CM, Fawaz M, Vonficht D, Tesio M, Collier P, Pavlinic D, Geiger H, Schroeder T, Benes V, Dick TP, Rieger MA, Stegle O & Trumpp A (2017) Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy. *Cell* 169, 807-823.e19.
- Cabezas-Wallscheid N, Klimmeck D, Hansson J, Lipka DB, Reyes A, Wang Q, Weichenhan D, Lier A, von Paleske L, Renders S, Wünsche P, Zeisberger P, Brocks D, Gu L, Herrmann C, Haas S, Essers MAG, Brors B, Eils R, Huber W, Milsom MD, Plass C, Krijgsveld J & Trumpp A (2014) Identification of Regulatory Networks in HSCs and Their Immediate Progeny via Integrated Proteome, Transcriptome, and DNA Methylation Analysis. *Cell Stem Cell* 15, 507–522.
- Calvanese V, Capellera-Garcia S, Ma F, Fares I, Liebscher S, Ng ES, Ekstrand S, Aguadé-Gorgorió J, Vavilina A, Lefaudeux D, Nadel B, Li JY, Wang Y, Lee LK, Ardehali R, Iruela-Arispe ML, Pellegrini M, Stanley EG, Elefanty AG, Schenke-Layland K & Mikkola HKA (2022) Mapping human haematopoietic stem cells from haemogenic endothelium to birth. *Nature* 604, 534–540.

- Cao A, Alluqmani N, Buhari FHM, Wasim L, Smith LK, Quaile AT, Shannon M, Hakim Z, Furmli H, Owen DM, Savchenko A & Treanor B (2018) Galectin-9 binds IgM-BCR to regulate B cell signaling. *Nat Commun* 9, 3288.
- Cao J, Spielmann M, Qiu X, Huang X, Ibrahim DM, Hill AJ, Zhang F, Mundlos S, Christiansen L, Steemers FJ, Trapnell C & Shendure J (2019) The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature* 566, 496–502.
- Carrelha J, Meng Y, Kettle LM, Luis TC, Norfo R, Alcolea V, Boukarabila H, Grasso F, Gambardella A, Grover A, Högstrand K, Lord AM, Sanjuan-Pla A, Woll PS, Nerlov C & Jacobsen SEW (2018) Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature* 554, 106–111.
- Castellano E & Downward J (2011) RAS Interaction with PI3K. *Genes Cancer* 2, 261–274.
- Castor A, Nilsson L, Åstrand-Grundström I, Buitenhuis M, Ramirez C, Anderson K, Strömbeck B, Garwicz S, Békássy AN, Schmiegelow K, Lausen B, Hokland P, Lehmann S, Juliusson G, Johansson B & Jacobsen SEW (2005) Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 11, 630–637.
- Cazzaniga G, Daniotti M, Tosi S, Giudici G, Aloisi A, Pogliani E, Kearney L & Biondi A (2001) The paired box domain gene PAX5 is fused to ETV6/TEL in an acute lymphoblastic leukemia case. *Cancer Res* 61, 4666–4670.
- Chagraoui J, Girard S, Spinella J-F, Simon L, Bonneil E, Mayotte N, MacRae T, Coulombe-Huntington J, Bertomeu T, Moison C, Tomellini E, Thibault P, Tyers M, Marinier A & Sauvageau G (2021) UM171 Preserves Epigenetic Marks that Are Reduced in Ex Vivo Culture of Human HSCs via Potentiation of the CLR3-KBTBD4 Complex. *Cell Stem Cell* 28, 48-62.e6.
- Chan LN, Murakami MA, Robinson ME, Caesar R, Sadras T, Lee J, Cosgun KN, Kume K, Khairnar V, Xiao G, Ahmed MA, Aghania E, Deb G, Hurtz C, Shojaee S, Hong C, Pölönen P, Nix MA, Chen Z, Chen CW, Chen J, Vogt A, Heinäniemi M, Lohi O, Wiita AP, Izraeli S, Geng H, Weinstock DM & Müschen M (2020) Signalling input from divergent pathways subverts B cell transformation. *Nature* 583, 845–851.
- Chapman NM, Boothby MR & Chi H (2020) Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nat Rev Immunol* 20, 55–70.
- Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E & Speck NA (2009) Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 457, 887–891.
- Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB & Pawson T (1995) Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378, 303–306.
- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X & Weissman IL (1999) In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 3120–3125.
- Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, Lavon N, Benvenisty N, Croce CM, Clark AT, Baxter T, Pyle AD, Teitell MA, Pelegri M, Plath K & Lowry



- WE (2009) Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111–123.
- Chuckran CA, Liu C, Bruno TC, Workman CJ & Vignali DA (2020) Neuropilin-1: a checkpoint target with unique implications for cancer immunology and immunotherapy. *J Immunother Cancer* 8, e000967.
- Clappier E, Gerby B, Sigaux F, Delord M, Touzri F, Hernandez L, Ballerini P, Baruchel A, Pflumio F & Soulier J (2011) Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J. Exp. Med.* 208, 653–661.
- Cobaleda C, Jochum W & Busslinger M (2007) Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* 449, 473–477.
- Cobaleda C & Sánchez-García I (2009) B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin. *BioEssays* 31, 600–609.
- Cohen S, Haimovich J & Hollander N (2013) Distinct processing of the pre-B cell receptor and the B cell receptor. *Molecular Immunology* 54, 115–121.
- Corcoran AE, Riddell A, Krooshoop D & Venkitaraman AR (1998) Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature* 391, 904–907.
- Cordeiro Gomes A, Hara T, Lim VY, Herndler-Brandstetter D, Nevius E, Sugiyama T, Taniichi S, Schlenner S, Richie E, Rodewald H-R, Flavell RA, Nagasawa T, Ikuta K & Pereira JP (2016) Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. *Immunity* 45, 1219–1231.
- Coşkun S, Chao H, Vasavada H, Heydari K, Gonzales N, Zhou X, de Crombrughe B & Hirschi KK (2014) Development of the Fetal Bone Marrow Niche and Regulation of HSC Quiescence and Homing Ability by Emerging Osteolineage Cells. *Cell Reports* 9, 581–590.
- Coyaud E, Struski S, Dastugue N, Brousset P, Broccardo C & Bradtke J (2010) PAX5-AUTS2 fusion resulting from t(7;9)(q11.2;p13.2) can now be classified as recurrent in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research* 34, e323–e325.
- Craig W, Kay R, Cutler RL & Lansdorp PM (1993) Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 177, 1331–1342.
- Czerny T, Schaffner G & Busslinger M (1993) DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev.* 7, 2048–2061.
- Danial NN & Korsmeyer SJ (2004) Cell Death: Critical Control Points. *Cell* 116, 205–219.
- Davis RL, Weintraub H & Lassar AB (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000.
- Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JGCAM, Peters STCJM, Van Zutven LJCM, Beverloo HB, Van der Spek PJ, Escherich G, Horstmann MA, Janka-Schaub GE, Kamps WA, Evans WE & Pieters R (2009) A

- subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 10, 125–134.
- Denoth-Lippuner A, Jaeger BN, Liang T, Royall LN, Chie SE, Buthey K, Machado D, Korobeynyk VI, Kruse M, Munz CM, Gerbaulet A, Simons BD & Jessberger S (2021) Visualization of individual cell division history in complex tissues using iCOUNT. *Cell Stem Cell* 28, 2020-2034.e12.
- Derudder E, Cadera EJ, Vahl JC, Wang J, Fox CJ, Zha S, van Loo G, Pasparakis M, Schlissel MS, Schmidt-Supprian M & Rajewsky K (2009) Development of immunoglobulin lambda-chain-positive B cells, but not editing of immunoglobulin kappa-chain, depends on NF-kappaB signals. *Nat Immunol* 10, 647–654.
- Desterke C, Bennaceur-Griscelli A & Turhan A (2021) EGR1 dysregulation defines an inflammatory and leukemic program in cell trajectory of human-aged hematopoietic stem cells (HSC). *Stem Cell Research & Therapy* 12.
- Dexter TM, Allen TD & Lajtha LG (1977) Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 91, 335–344.
- Di Tullio A, Manh TPV, Schubert A, Castellano G, Månsson R & Graf T (2011) CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ )-induced transdifferentiation of pre-B cells into macrophages involves no overt retrodifferentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 17016–17021.
- Ding Y-Y, Kim H, Madden K, Loftus JP, Chen GM, Allen DH, Zhang R, Xu J, Chen C-H, Hu Y, Tasian SK & Tan K (2021) Network Analysis Reveals Synergistic Genetic Dependencies for Rational Combination Therapy in Philadelphia Chromosome–Like Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Cancer Research* 27, 5109–5122.
- Djokic M, Björklund E, Blennow E, Mazur J, Söderhäll S & Porwit A (2009) Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 94, 1016–1019.
- Dobson SM, García-Prat L, Vanner RJ, Wintersinger J, Waanders E, Gu Z, McLeod J, Gan OI, Grandal I, Payne-Turner D, Edmonson MN, Ma X, Fan Y, Voisin V, Chan-Seng-Yue M, Xie SZ, Hosseini M, Abelson S, Gupta P, Rusch M, Shao Y, Olsen SR, Neale G, Chan SM, Bader G, Easton J, Guidos CJ, Danska JS, Zhang J, Minden MD, Morris Q, Mullighan CG & Dick JE (2020) Relapse-Fated Latent Diagnosis Subclones in Acute B Lineage Leukemia Are Drug Tolerant and Possess Distinct Metabolic Programs. *Cancer Discov* 10, 568–587.
- Donadieu J, Lamant M, Fieschi C, Sicre de Fontbrune F, Caye A, Ouachee M, Beaupain B, Bustamante J, Poirel HA, Isidor B, Van Den Neste E, Neel A, Nimubona S, Toutain F, Barlogis V, Schleinitz N, Leblanc T, Rohrlich P, Suarez F, Ranta D, Abou Chahla W, Bruno B, Terriou L, Francois S, Lioure B, Ahle G, Bachelerie F, Preudhomme C, Delabesse E, Cavé H, Bellanné-Chantelot C, Pasquet M, & French GATA2 working party (2018) Natural history of GATA2 deficiency in a survey of 79 French and Belgian patients. *Haematologica*.
- van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécresse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepański T, Kalina T,

- de Tute R, Brüggemann M, Sedek L, Cullen M, Langerak AW, Mendonça A, Macintyre E, Martin-Ayuso M, Hrusak O, Vidriales MB & Orfao A (2012) EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 26, 1908–1975.
- Driessen EMC, Roon EHJ van, Spijkers-Hagelstein JAP, Schneider P, Lorenzo P de, Valsecchi MG, Pieters R & Stam RW (2013) Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica* 98, 937–944.
- Duployez N, Jamrog LA, Fregona V, Hamelle C, Fenwarth L, Lejeune S, Helevaut N, Geffroy S, Caillault A, Marceau-Renaut A, Poulain S, Roche-Lestienne C, Largeaud L, Prade N, Dufrechou S, Hébrard S, Berthon C, Nelken B, Fernandes J, Villenet C, Figeac M, Gerby B, Delabesse E, Preudhomme C & Broccardo C (2021) Germline PAX5 mutation predisposes to familial B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 137, 1424–1428.
- Duque-Afonso J, Feng J, Scherer F, Lin C-H, Wong SHK, Wang Z, Iwasaki M & Cleary ML (2015) Comparative genomics reveals multistep pathogenesis of E2A-PBX1 acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.* 125, 3667–3680.
- Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC & Levy DE (1996) Targeted Disruption of the Mouse Stat1 Gene Results in Compromised Innate Immunity to Viral Disease. *Cell* 84, 443–450.
- Dzierzak E & Bigas A (2018) Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell Stem Cell* 22, 639–651.
- Ebinger S, Özdemir EZ, Ziegenhain C, Tiedt S, Castro Alves C, Grunert M, Dworzak M, Lutz C, Turati VA, Enver T, Horny H-P, Sotlar K, Parekh S, Spiekermann K, Hiddemann W, Schepers A, Polzer B, Kirsch S, Hoffmann M, Knapp B, Hasenauer J, Pfeifer H, Panzer-Grümayer R, Enard W, Gires O & Jeremias I (2016) Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 30, 849–862.
- Ehninger A, Boch T, Uckelmann H, Essers MA, Müdder K, Sleckman BP & Trumpp A (2014) Posttranscriptional regulation of c-Myc expression in adult murine HSCs during homeostasis and interferon- $\alpha$ -induced stress response. *Blood* 123, 3909–3913.
- Ema H & Nakauchi H (2000) Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 95, 2284–2288.
- Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H & Hochedlinger K (2009) Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41, 968–976.
- Erasmus MF, Matlawska-Wasowska K, Kinjyo I, Mahajan A, Winter SS, Xu L, Horowitz M, Lidke DS & Wilson BS (2016) Dynamic pre-BCR homodimers fine-tune autonomous survival signals in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Science Signaling* 9, ra116–ra116.

- Essers MAG, Offner S, Blanco-Bose WE, Waibler Z, Kalinke U, Duchosal MA & Trumpp A (2009) IFN $\alpha$  activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458, 904–908.
- Fadlullah MZH, Neo WH, Lie-a-ling M, Thambyrajah R, Patel R, Mevel R, Aksoy I, Do Khoa N, Savatier P, Fontenille L, Baker SM, Rattray M, Kouskoff V & Lacaud G (2022) Murine AGM single-cell profiling identifies a continuum of hemogenic endothelium differentiation marked by ACE. *Blood* 139, 343–356.
- Familiades J, Bousquet M, Lafage-Pochitaloff M, Béné M-C, Beldjord K, De Vos J, Dastugue N, Coyaud E, Struski S, Quelen C, Prade-Houdellier N, Dobbelstein S, Cayuela J-M, Soulier J, Grardel N, Preudhomme C, Cavé H, Blanchet O, Lhéritier V, Delannoy A, Chalandon Y, Ifrah N, Pigneux A, Brousset P, Macintyre EA, Huguet F, Dombret H, Broccardo C & Delabesse E (2009) PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study. *Leukemia* 23, 1989–1998.
- Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, Gingras S, Ruel R, Mayotte N, Csaszar E, Knapp DJHF, Miller P, Ngom M, Imren S, Roy D-C, Watts KL, Kiem H-P, Herrington R, Iscove NN, Humphries RK, Eaves CJ, Cohen S, Marinier A, Zandstra PW & Sauvageau G (2014) Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science* 345, 1509–1512.
- Fazio G, Biondi A & Cazzanig G (2011) The Role of PAX5 in ALL. In S. Faderl, ed. *Novel Aspects in Acute Lymphoblastic Leukemia*. InTech. Available at: <http://www.intechopen.com/books/novel-aspects-in-acute-lymphoblastic-leukemia/the-role-of-pax5-in-all> [Accessed February 6, 2023].
- Fazio G, Daniele G, Cazzaniga V, Impera L, Severgnini M, Iacobucci I, Galbiati M, Leszl A, Cifola I, De Bellis G, Bresciani P, Martinelli G, Basso G, Biondi A, Storlazzi CT & Cazzaniga G (2015) Three novel fusion transcripts of the paired box 5 gene in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 100, e14–e17.
- Fischer U, Forster M, Rinaldi A, Risch T, Sungalee S, Warnatz H-J, Bornhauser B, Gombert M, Kratsch C, Stütz AM, Sultan M, Tchinda J, Worth CL, Amstislavskiy V, Badarinarayan N, Baruchel A, Bartram T, Basso G, Canpolat C, Cario G, Cavé H, Dakaj D, Delorenzi M, Dobay MP, Eckert C, Ellinghaus E, Eugster S, Frismantas V, Ginzl S, Haas OA, Heidenreich O, Hemmrich-Stanisak G, Hezaveh K, Höll JI, Hornhardt S, Husemann P, Kachroo P, Kratz CP, Kronnie G te, Marovca B, Niggli F, McHardy AC, Moorman AV, Panzer-Grümayer R, Petersen BS, Raeder B, Ralser M, Rosenstiel P, Schäfer D, Schrappe M, Schreiber S, Schütte M, Stade B, Thiele R, Weid N von der, Vora A, Zaliouva M, Zhang L, Zichner T, Zimmermann M, Lehrach H, Borkhardt A, Bourquin J-P, Franke A, Korbelt JO, Stanulla M & Yaspo M-L (2015) Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat Genet* 47, 1020–1029.
- Flemming A, Brummer T, Reth M & Jumaa H (2003) The adaptor protein SLP-65 acts as a tumor suppressor that limits pre-B cell expansion. *Nat Immunol* 4, 38–43.
- Florian MC, Klose M, Sacma M, Jablanovic J, Knudson L, Nattamai KJ, Marka G, Vollmer A, Soller K, Sakk V, Cabezas-Wallscheid N, Zheng Y, Mulaw MA, Glauche I & Geiger H

- (2018) Aging alters the epigenetic asymmetry of HSC division. *PLOS Biology* 16, e2003389.
- Forestier E, Heyman M, Andersen MK, Autio K, Blennow E, Borgström G, Golovleva I, Heim S, Heinonen K, Hovland R, Johannsson JH, Kerndrup G, Nordgren A, Rosenquist R, Swolin B, Johannsson B, Nordic Society of Paediatric Haematology, Oncology (NOPHO), Swedish Cytogenetic Leukaemia Study Group (SCLSG), & NOPHO Leukaemia Cytogenetic Study Group (NLCSG) (2008) Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival. *Br J Haematol* 140, 665–672.
- Foudi A, Hochedlinger K, Van Buren D, Schindler JW, Jaenisch R, Carey V & Hock H (2009) Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 27, 84–90.
- von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE & Murray R (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181, 1519–1526.
- Fregona V, Bayet M & Gerby B (2021) Oncogene-Induced Reprogramming in Acute Lymphoblastic Leukemia: Towards Targeted Therapy of Leukemia-Initiating Cells. *Cancers* 13, 5511.
- van Galen P, Kreso A, Mbong N, Kent DG, Fitzmaurice T, Chambers JE, Xie S, Laurenti E, Hermans K, Eppert K, Marciniak SJ, Goodall JC, Green AR, Wouters BG, Wienholds E & Dick JE (2014) The unfolded protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress. *Nature* 510, 268–272.
- Galloway A, Saveliev A, Łukasiak S, Hodson DJ, Bolland D, Balmanno K, Ahlfors H, Monzón-Casanova E, Mannurita SC, Bell LS, Andrews S, Díaz-Muñoz MD, Cook SJ, Corcoran A & Turner M (2016) RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 promote cell quiescence. *Science* 352, 453–459.
- Gao H, Lukin K, Ramírez J, Fields S, Lopez D & Hagman J (2009) Opposing effects of SWI/SNF and Mi-2/NuRD chromatin remodeling complexes on epigenetic reprogramming by EBF and Pax5. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 11258–11263.
- Gauthier L, Rossi B, Roux F, Termine E & Schiff C (2002) Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 13014–13019.
- Gekas C & Graf T (2013) CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood* 121, 4463–4472.
- Geng H, Hurtz C, Lenz KB, Chen Z, Baumjohann D, Thompson S, Goloviznina NA, Chen W-Y, Huan J, LaTocha D, Ballabio E, Xiao G, Lee J-W, Deucher A, Qi Z, Park E, Huang C, Nahar R, Kweon S-M, Shojaee S, Chan LN, Yu J, Kornblau SM, Bijl JJ, Ye BH, Mark Ansel K, Paietta E, Melnick A, Hunger SP, Kurre P, Tyner JW, Loh ML, Roeder RG, Druker BJ, Burger JanA, Milne TA, Chang BH & Müschen M (2015) Self-Enforcing Feedback Activation between BCL6 and Pre-B Cell Receptor Signaling

- Defines a Distinct Subtype of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 27, 409–425.
- Georgopoulos K (2017) The making of a lymphocyte: the choice among disparate cell fates and the IKAROS enigma. *Genes Dev* 31, 439–450.
- Georgopoulos K, Bigby M, Wang J-H, Molnar A, Wu P, Winandy S & Sharpe A (1994) The ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143–156.
- Ghia P, ten Boekel E, Rolink AG & Melchers F (1998) B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunology Today* 19, 480–485.
- Giampaolo S, Wójcik G, Klein-Hessling S, Serfling E & Patra AK (2019) B cell development is critically dependent on NFATc1 activity. *Cell Mol Immunol* 16, 508–520.
- Giudicelli V, Duroux P, Ginestoux C, Folch G, Jabado-Michaloud J, Chaume D & Lefranc M-P (2006) IMGT/LIGM-DB, the IMGT® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* 34, D781–D784.
- Goetz CA, Harmon IR, O’Neil JJ, Burchill MA & Farrar MA (2004) STAT5 Activation Underlies IL7 Receptor-Dependent B Cell Development<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology* 172, 4770–4778.
- Golan-Lavi R, Giacomelli C, Fuks G, Zeisel A, Sonntag J, Sinha S, Köstler W, Wiemann S, Korf U, Yarden Y & Domany E (2017) Coordinated Pulses of mRNA and of Protein Translation or Degradation Produce EGF-Induced Protein Bursts. *Cell Rep* 18, 3129–3142.
- Goldberg LR, Dooner MS, Johnson KW, Papa EF, Pereira MG, Del Tatto M, Adler DM, Aliotta JM & Quesenberry PJ (2014) The murine long-term multi-lineage renewal marrow stem cell is a cycling cell. *Leukemia* 28, 813–822.
- Good Z, Sarno J, Jager A, Samusik N, Aghaeepour N, Simonds EF, White L, Lacayo NJ, Fantl WJ, Fazio G, Gaipa G, Biondi A, Tibshirani R, Bendall SC, Nolan GP & Davis KL (2018) Single-cell developmental classification of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia at diagnosis reveals predictors of relapse. *Nat Med* 24, 474–483.
- Gothot A, Pyatt R, McMahel J, Rice S & Srour EF (1997) Functional Heterogeneity of Human CD34+ Cells Isolated in Subcompartments of the G0/G1 Phase of the Cell Cycle. *Blood* 90, 4384–4393.
- Greaves M (2018) A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 18, 471–484.
- Greaves M, Cazzaniga V & Ford A (2021) Can we prevent childhood Leukaemia? *Leukemia* 35, 1258–1264.
- Gu Z, Churchman ML, Roberts KG, Moore I, Zhou X, Nakitandwe J, Hagiwara K, Pelletier S, Gingras S, Berns H, Payne-Turner D, Hill A, Iacobucci I, Shi L, Pounds S, Cheng C, Pei D, Qu C, Newman S, Devidas M, Dai Y, Reshmi SC, Gastier-Foster J, Raetz EA, Borowitz MJ, Wood BL, Carroll WL, Zweidler-McKay PA, Rabin KR, Mattano LA, Maloney KW, Rambaldi A, Spinelli O, Radich JP, Minden MD, Rowe JM, Luger S,

- Litzow MR, Tallman MS, Racevskis J, Zhang Y, Bhatia R, Kohlschmidt J, Mrózek K, Bloomfield CD, Stock W, Kornblau S, Kantarjian HM, Konopleva M, Evans WE, Jeha S, Pui C-H, Yang J, Paietta E, Downing JR, Relling MV, Zhang J, Loh ML, Hunger SP & Mullighan CG (2019) PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 51, 296–307.
- de Haan G & Van Zant G (1999) Dynamic Changes in Mouse Hematopoietic Stem Cell Numbers During Aging. *Blood* 93, 3294–3301.
- Habib T, Park H, Tsang M, de Alborán IM, Nicks A, Wilson L, Knoepfler PS, Andrews S, Rawlings DJ, Eisenman RN & Iritani BM (2007) Myc stimulates B lymphocyte differentiation and amplifies calcium signaling. *J Cell Biol* 179, 717–731.
- Hajdu SI (2003) The Discovery of Blood Cells. *Ann Clin Lab Sci* 33, 237–238.
- Hanahan D (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* 12, 31–46.
- Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creyghton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA & Jaenisch R (2008) Direct Reprogramming of Terminally Differentiated Mature B Lymphocytes to Pluripotency. *Cell* 133, 250–264.
- Hao J, Zhou H, Nemes K, Yen D, Zhao W, Bramlett C, Wang B, Lu R & Shen K (2021) Membrane-bound SCF and VCAM-1 synergistically regulate the morphology of hematopoietic stem cells. *Journal of Cell Biology* 220, e202010118.
- Hardy RR & Hayakawa K (2001) B Cell Development Pathways. *Annual Review of Immunology* 19, 595–621.
- Harvey RC, Mullighan CG, Chen I-M, Wharton W, Mikhail FM, Carroll AJ, Kang H, Liu W, Dobbin KK, Smith MA, Carroll WL, Devidas M, Bowman WP, Camitta BM, Reaman GH, Hunger SP, Downing JR & Willman CL (2010) Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115, 5312–5321.
- Hawkins ED, Oliaro J, Kallies A, Belz GT, Filby A, Hogan T, Haynes N, Ramsbottom KM, Van Ham V, Kinwell T, Seddon B, Davies D, Tarlinton D, Lew AM, Humbert PO & Russell SM (2013) Regulation of asymmetric cell division and polarity by Scribble is not required for humoral immunity. *Nat Commun* 4, 1801.
- He T, Hong SY, Huang L, Xue W, Yu Z, Kwon H, Kirk M, Ding S, Su K & Zhang Z (2011) Histone acetyltransferase p300 acetylates Pax5 and strongly enhances Pax5-mediated transcriptional activity. *J Biol Chem* 286, 14137–14145.
- Hein D, Dreisig K, Metzler M, Izraeli S, Schmiegelow K, Borkhardt A & Fischer U (2019) The preleukemic TCF3-PBX1 gene fusion can be generated in utero and is present in ≈0.6% of healthy newborns. *Blood* 134, 1355–1358.
- Heltemes-Harris LM, Willette MJL, Ramsey LB, Qiu YH, Neeley ES, Zhang N, Thomas DA, Koeuth T, Baechler EC, Kornblau SM & Farrar MA (2011) Ebf1 or Pax5

- haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Experimental Medicine* 208, 1135–1149.
- Hérault L, Poplineau M, Mazuel A, Platet N, Remy É & Duprez E (2021) Single-cell RNA-seq reveals a concomitant delay in differentiation and cell cycle of aged hematopoietic stem cells. *BMC Biology* 19, 19.
- Heydt Q, Xintaropoulou C, Clear A, Austin M, Pislariu I, Miraki-Moud F, Cutillas P, Korfi K, Calaminici M, Cawthorn W, Suchacki K, Nagano A, Gribben JG, Smith M, Cavenagh JD, Oakervee H, Castleton A, Taussig D, Peck B, Wilczynska A, McNaughton L, Bonnet D, Mardakheh F & Patel B (2021) Adipocytes disrupt the translational programme of acute lymphoblastic leukaemia to favour tumour survival and persistence. *Nat Commun* 12, 5507.
- Hiebert SW, Sun W, Davis JN, Golub T, Shurtleff S, Buijs A, Downing JR, Grosveld G, Roussell MF, Gilliland DG, Lenny N & Meyers S (1996) The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol* 16, 1349–1355.
- Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, Yaguchi A, Terada K, Saito Y, Yoshimi A, Ogata-Kawata H, Sakamoto H, Kato M, Fujimura J, Hino M, Kinoshita A, Kakuda H, Kurosawa H, Kato K, Kajiwara R, Moriwaki K, Morimoto T, Nakamura K, Noguchi Y, Osumi T, Sakashita K, Takita J, Yuza Y, Matsuda K, Yoshida T, Matsumoto K, Hata K, Kubo M, Matsubara Y, Fukushima T, Koh K, Manabe A, Ohara A & Kiyokawa N (2017) ZNF384-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. *Haematologica* 102, 118–129.
- Hogan CJ, Shpall EJ & Keller G (2002) Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34+ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 413–418.
- Holmes ML, Carotta S, Corcoran LM & Nutt SL (2006) Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. *Genes Dev* 20, 933–938.
- Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, Green J, Colman S, Piacibello W, Buckle V, Tsuzuki S, Greaves M & Enver T (2008) Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* 319, 336–339.
- Hotfilder M, Röttgers S, Rosemann A, Schrauder A, Schrappe M, Pieters R, Jürgens H, Harbott J & Vormoor J (2005) Leukemic Stem Cells in Childhood High-Risk ALL/t(9;22) and t(4;11) Are Present in Primitive Lymphoid-Restricted CD34+CD19- Cells. *Cancer Research* 65, 1442–1449.
- Hou S, Li Z, Zheng X, Gao Y, Dong J, Ni Y, Wang X, Li Y, Ding X, Chang Z, Li S, Hu Y, Fan X, Hou Y, Wen L, Liu B, Tang F & Lan Y (2020) Embryonic endothelial evolution towards first hematopoietic stem cells revealed by single-cell transcriptomic and functional analyses. *Cell Res* 30, 376–392.
- Hu Y, Zhang Z, Kashiwagi M, Yoshida T, Joshi I, Jena N, Somasundaram R, Emmanuel AO, Sigvardsson M, Fitamant J, El-Bardeesy N, Gounari F, Van Etten RA & Georgopoulos



- K (2016) Superenhancer reprogramming drives a B-cell-epithelial transition and high-risk leukemia. *Genes Dev* 30, 1971–1990.
- Ieda M, Fu J-D, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG & Srivastava D (2010) Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors. *Cell* 142, 375–386.
- Inlay MA, Bhattacharya D, Sahoo D, Serwold T, Seita J, Karsunky H, Plevritis SK, Dill DL & Weissman IL (2009) Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. *Genes Dev.* 23, 2376–2381.
- Iritani BM & Eisenman RN (1999) c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 13180–13185.
- Isidro-Hernández M, Mayado A, Casado-García A, Martínez-Cano J, Palmi C, Fazio G, Orfao A, Ribera J, Ribera JM, Zamora L, Raboso-Gallego J, Blanco O, Alonso-López D, De Las Rivas J, Jiménez R, García Criado FJ, García Cenador MB, Ramírez-Orellana M, Cazzaniga G, Cobaleda C, Vicente-Dueñas C & Sánchez-García I (2020) Inhibition of inflammatory signaling in Pax5 mutant cells mitigates B-cell leukemogenesis. *Sci Rep* 10, 19189.
- Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, Ledergor G, Jung Y, Milo I, Poulos MG, Kalinkovich A, Ludin A, Kollet O, Shakhar G, Butler JM, Rafii S, Adams RH, Scadden DT, Lin CP & Lapidot T (2016) Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* 532, 323–328.
- Ito CY, Li CYJ, Bernstein A, Dick JE & Stanford WL (2003) Hematopoietic stem cell and progenitor defects in Sca-1/Ly-6A–null mice. *Blood* 101, 517–523.
- Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y & Suda T (2006) Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12, 446–451.
- Itokawa N, Oshima M, Koide S, Takayama N, Kuribayashi W, Nakajima-Takagi Y, Aoyama K, Yamazaki S, Yamaguchi K, Furukawa Y, Eto K & Iwama A (2022) Epigenetic traits inscribed in chromatin accessibility in aged hematopoietic stem cells. *Nat Commun* 13, 2691.
- Ivanovs A, Rybtsov S, Welch L, Anderson RA, Turner ML & Medvinsky A (2011) Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *J Exp Med* 208, 2417–2427.
- Iwasaki H, Mizuno S, Wells RA, Cantor AB, Watanabe S & Akashi K (2003) GATA-1 Converts Lymphoid and Myelomonocytic Progenitors into the Megakaryocyte/Erythrocyte Lineages. *Immunity* 19, 451–462.
- Jamrog L, Chemin G, Fregona V, Coster L, Pasquet M, Oudinet C, Rouquié N, Prade N, Lagarde S, Cresson C, Hébrard S, Nguyen Huu NS, Bousquet M, Quelen C, Brousset P, Mancini SJC, Delabesse E, Khamlichi AA, Gerby B & Broccardo C (2018) PAX5-ELN oncoprotein promotes multistep B-cell acute lymphoblastic leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 10357–10362.

- Jerchel IS, Hoogkamer AQ, Ariës IM, Steeghs EMP, Boer JM, Besselink NJM, Boeree A, van de Ven C, de Groot-Kruseman HA, de Haas V, Horstmann MA, Escherich G, Zwaan CM, Cuppen E, Koudijs MJ, Pieters R & den Boer ML (2018) RAS pathway mutations as a predictive biomarker for treatment adaptation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 32, 931–940.
- Jia W, Kong L, Kidoya H, Naito H, Muramatsu F, Hayashi Y, Hsieh H-Y, Yamakawa D, Hsu DK, Liu F-T & Takakura N (2021) Indispensable role of Galectin-3 in promoting quiescence of hematopoietic stem cells. *Nat Commun* 12, 2118.
- Jiang Q, Li WQ, Hofmeister RR, Young HA, Hodge DR, Keller JR, Khaled AR & Durum SK (2004) Distinct Regions of the Interleukin-7 Receptor Regulate Different Bcl2 Family Members. *Molecular and Cellular Biology* 24, 6501–6513.
- Jiang Z, Deng M, Wei X, Ye W, Xiao Y, Lin S, Wang S, Li B, Liu X, Zhang G, Lai P, Weng J, Wu D, Chen H, Wei W, Ma Y, Li Y, Liu P, Du X, Pei D, Yao Y, Xu B & Li P (2016) Heterogeneity of CD34 and CD38 expression in acute B lymphoblastic leukemia cells is reversible and not hierarchically organized. *Journal of Hematology & Oncology* 9, 94.
- Johnson SE, Shah N, Panoskaltsis-Mortari A & LeBien TW (2005) Murine and Human IL-7 Activate STAT5 and Induce Proliferation of Normal Human Pro-B Cells<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology* 175, 7325–7331.
- Jumaa H, Wollscheid B, Mitterer M, Wienands J, Reth M & Nielsen PJ (1999) Abnormal Development and Function of B Lymphocytes in Mice Deficient for the Signaling Adaptor Protein SLP-65. *Immunity* 11, 547–554.
- Kandi R, Senger K, Grigoryan A, Soller K, Sakk V, Schuster T, Eiwen K, Menon MB, Gaestel M, Zheng Y, Florian MC & Geiger H (2021) Cdc42-Borg4-Septin7 axis regulates HSC polarity and function. *EMBO Rep* 22, e52931.
- Kang J & Der SD (2004) Cytokine functions in the formative stages of a lymphocyte's life. *Curr Opin Immunol* 16, 180–190.
- Kanie T, Abe A, Matsuda T, Kuno Y, Towatari M, Yamamoto T, Saito H, Emi N & Naoe T (2004) TEL-Syk fusion constitutively activates PI3-K/Akt, MAPK and JAK2-independent STAT5 signal pathways. *Leukemia* 18, 548–555.
- Kantarjian H, Thomas D, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Jeha S, Bueso-Ramos CE, Pierce S, Shan J, Koller C, Beran M, Keating M & Freireich EJ (2004) Long-term follow-up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 101, 2788–2801.
- Katagiri T, Ogimoto M, Hasegawa K, Arimura Y, Mitomo K, Okada M, Clark MR, Mizuno K & Yakura H (1999) CD45 Negatively Regulates Lyn Activity by Dephosphorylating Both Positive and Negative Regulatory Tyrosine Residues in Immature B Cells<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology* 163, 1321–1326.
- Katerndahl CDS, Heltemes-Harris LM, Willette MJL, Henzler CM, Fietze S, Yang R, Schjerven H, Silverstein KAT, Ramsey LB, Hubbard G, Wells AD, Kuiper RP, Scheijen

- B, van Leeuwen FN, Müschen M, Kornblau SM & Farrar MA (2017) STAT5 antagonism of B cell enhancer networks drives leukemia and poor patient survival. *Nat Immunol* 18, 694–704.
- Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig W-D, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR & Koefler HP (2008) Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood* 111, 776–784.
- Khabirova E, Jardine L, Coorens THH, Webb S, Treger TD, Engelbert J, Porter T, Prigmore E, Collord G, Piapi A, Teichmann SA, Inglott S, Williams O, Heidenreich O, Young MD, Straathof K, Bomken S, Bartram J, Haniffa M & Behjati S (2022) Single-cell transcriptomics reveals a distinct developmental state of KMT2A-rearranged infant B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 28, 743–751.
- Kiel MJ, He S, Ashkenazi R, Gentry SN, Teta M, Kushner JA, Jackson TL & Morrison SJ (2007) Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature* 449, 238–242.
- Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C & Morrison SJ (2005) SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* 121, 1109–1121.
- Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Araúzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M & Schöler HR (2008) Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454, 646–650.
- Kim KM, Mura-Meszaros A, Tollot M, Krishnan MS, Gründl M, Neubert L, Groth M, Rodriguez-Fraticelli A, Svendsen AF, Campaner S, Andreas N, Kamradt T, Hoffmann S, Camargo FD, Heidel FH, Bystrykh LV, de Haan G & von Eyss B (2022) Taz protects hematopoietic stem cells from an aging-dependent decrease in PU.1 activity. *Nat Commun* 13, 5187.
- Kimura S, Montefiori L, Iacobucci I, Zhao Y, Gao Q, Paietta EM, Haferlach C, Laird AD, Mead PE, Gu Z, Stock W, Litzow M, Rowe JM, Luger SM, Hunger SP, Ryland GL, Schmidt B, Ekert PG, Oshlack A, Grimmond SM, Rehn J, Breen J, Yeung D, White DL, Aldoss I, Jabbour EJ, Pui C-H, Meggendorfer M, Walter W, Kern W, Haferlach T, Brady S, Zhang J, Roberts KG, Blombery P & Mullighan CG (2022) Enhancer retargeting of CDX2 and UBTF::ATXN7L3 define a subtype of high-risk B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 139, 3519–3531.
- Knoblich JA, Jan LY & Jan YN (1995) Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* 377, 624–627.
- Knoll M, Yanagisawa Y, Simmons S, Engels N, Wienands J, Melchers F & Ohnishi K (2012) The Non-Ig Parts of the VpreB and  $\lambda 5$  Proteins of the Surrogate Light Chain Play Opposite Roles in the Surface Representation of the Precursor B Cell Receptor. *The Journal of Immunology* 188, 6010–6017.
- Köhler S, Havranek O, Seyfried F, Hurtz C, Coffey GP, Kim E, Ten Hacken E, Jäger U, Vanura K, O'Brien S, Thomas DA, Kantarjian H, Ghosh D, Wang Z, Zhang M, Ma W, Jumaa

- H, Debatin K-M, Müschen M, Meyer LH, Davis RE & Burger JA (2016) Pre-BCR signaling in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1 and MYC, and can be targeted by SYK inhibition. *Leukemia* 30, 1246–1254.
- Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, Karaskova J, Minkin S, Lipton J & Squire JA (2001) Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood* 97, 3581–3588.
- Kong Y, Yoshida S, Saito Y, Doi T, Nagatoshi Y, Fukata M, Saito N, Yang SM, Iwamoto C, Okamura J, Liu KY, Huang XJ, Lu DP, Shultz LD, Harada M & Ishikawa F (2008) CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> as well as CD34<sup>+</sup>CD38<sup>–</sup>CD19<sup>+</sup> cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia* 22, 1207–1213.
- Koochaki SHJ, Słabicki M, Lumpkin R, Zou C, Belizaire R, Fischer ES & Ebert BL (2022) A STUB1 ubiquitin ligase/CHIC2 protein complex negatively regulates the IL-3, IL-5, and GM-CSF cytokine receptor common  $\beta$  chain (CSF2RB) protein stability. *Journal of Biological Chemistry* 298, 102484.
- Kozmik Z, Wang S, Dörfler P, Adams B & Busslinger M (1992) The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol* 12, 2662–2672.
- Kraus H, Kaiser S, Aumann K, Bönelt P, Salzer U, Vestweber D, Erlacher M, Kunze M, Burger M, de la Rosa K, Sic H, Rolink A, Eibel H & Rizzi M (2013) A Feeder-Free Differentiation System Identifies Autonomously Proliferating B Cell Precursors in Human Bone Marrow. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192.
- Krivtsov AV, Feng Z, Lemieux ME, Faber J, Vempati S, Sinha AU, Xia X, Jesneck J, Bracken AP, Silverman LB, Kutok JL, Kung AL & Armstrong SA (2008) H3K79 Methylation Profiles Define Murine and Human MLL-AF4 Leukemias. *Cancer Cell* 14, 355–368.
- Kruta M, Sunshine MJ, Chua BA, Fu Y, Chawla A, Dillingham CH, Hidalgo San Jose L, De Jong B, Zhou FJ & Signer RAJ (2021) Hsf1 promotes hematopoietic stem cell fitness and proteostasis in response to ex vivo culture stress and aging. *Cell Stem Cell* 28, 1950-1965.e6.
- Kulesa H, Frampton J & Graf T (1995) GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes Dev* 9, 1250–1262.
- Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, Mar JC, Bergman A & Frenette PS (2013) Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 502, 637–643.
- Kunz L & Schroeder T (2019) A 3D Tissue-wide Digital Imaging Pipeline for Quantitation of Secreted Molecules Shows Absence of CXCL12 Gradients in Bone Marrow. *Cell Stem Cell* 25, 846-854.e4.
- Kuribayashi W, Oshima M, Itokawa N, Koide S, Nakajima-Takagi Y, Yamashita M, Yamazaki S, Rahmutulla B, Miura F, Ito T, Kaneda A & Iwama A (2020) Limited rejuvenation of aged hematopoietic stem cells in young bone marrow niche. *J Exp Med* 218, e20192283.

- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL & Grompe M (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229–1234.
- Lallemand-Breitenbach V, Guillemain M-C, Janin A, Daniel M-T, Degos L, Kogan SC, Michael Bishop J & de Thé H (1999) Retinoic Acid and Arsenic Synergize to Eradicate Leukemic Cells in a Mouse Model of Acute Promyelocytic Leukemia. *J Exp Med* 189, 1043–1052.
- Lang F, Wojcik B, Bothur S, Knecht C, Falkenburg JHF, Schroeder T, Serve H, Ottmann OG & Rieger MA (2017) Plastic CD34 and CD38 expression in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia explains ambiguity of leukemia-initiating stem cell populations. *Leukemia* 31, 731–734.
- Lange M, Bergen V, Klein M, Setty M, Reuter B, Bakhti M, Lickert H, Ansari M, Schniering J, Schiller HB, Pe'er D & Theis FJ (2022) CellRank for directed single-cell fate mapping. *Nat Methods* 19, 159–170.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA & Dick JE (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648.
- Lareau CA, Ludwig LS, Muus C, Gohil SH, Zhao T, Chiang Z, Pelka K, Verboon JM, Luo W, Christian E, Rosebrock D, Getz G, Boland GM, Chen F, Buenrostro JD, Hacohen N, Wu CJ, Aryee MJ, Regev A & Sankaran VG (2021) Massively parallel single-cell mitochondrial DNA genotyping and chromatin profiling. *Nat Biotechnol* 39, 451–461.
- Laurenti E, Frelin C, Xie S, Ferrari R, Dunant CF, Zandi S, Neumann A, Plumb I, Doulatov S, Chen J, April C, Fan J-B, Iscove N & Dick JE (2015) CDK6 levels regulate quiescence exit in human hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 16, 302–313.
- Laurenti E, Varnum-Finney B, Wilson A, Ferrero I, Blanco-Bose WE, Ehninger A, Knoepfler PS, Cheng P-F, MacDonald HR, Eisenman RN, Bernstein ID & Trumpp A (2008) Hematopoietic Stem Cell Function and Survival Depend on c-Myc and N-Myc Activity. *Cell Stem Cell* 3, 611–624.
- Laval B de, Maurizio J, Kandalla PK, Brisou G, Simonnet L, Huber C, Gimenez G, Matcovitch-Natan O, Reinhardt S, David E, Mildner A, Leutz A, Nadel B, Bordi C, Amit I, Sarrazin S & Sieweke MH (2020) C/EBP $\beta$ -Dependent Epigenetic Memory Induces Trained Immunity in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 26, 657-674.e8.
- Lazorchak AS, Wojciechowski J, Dai M & Zhuang Y (2006) E2A Promotes the Survival of Precursor and Mature B Lymphocytes. *J Immunol* 177, 2495–2504.
- Lee S-T, Ji Y, Kim H-J, Ki C-S, Jung CW, Kim J-W & Kim S-H (2012) Sequential array comparative genomic hybridization analysis identifies copy number changes during blastic transformation of chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research* 36, 418–421.
- Lee Y-L, Ito K, Pi W-C, Lin I-H, Chu C-S, Malik S, Cheng I-H, Chen W-Y & Roeder RG (2021) Mediator subunit MED1 is required for E2A-PBX1-mediated oncogenic transcription and leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e1922864118.

- Lessard JA & Crabtree GR (2010) Chromatin regulatory mechanisms in pluripotency. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 503–532.
- Levy S (2014) Function of the tetraspanin molecule CD81 in B and T cells. *Immunol Res* 58, 179–185.
- Li J (2011) Quiescence regulators for hematopoietic stem cell. *Experimental Hematology* 39, 511–520.
- Li J-F, Dai Y-T, Lilljebjörn H, Shen S-H, Cui B-W, Bai L, Liu Y-F, Qian M-X, Kubota Y, Kiyoi H, Matsumura I, Miyazaki Y, Olsson L, Tan AM, Ariffin H, Chen J, Takita J, Yasuda T, Mano H, Johansson B, Yang JJ, Yeoh AE-J, Hayakawa F, Chen Z, Pui C-H, Fioretos T, Chen S-J & Huang J-Y (2018) Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, E11711–E11720.
- Li Y, Kong W, Yang W, Patel RM, Casey EB, Okeyo-Owuor T, White JM, Porter SN, Morris SA & Magee JA (2020) Single-Cell Analysis of Neonatal HSC Ontogeny Reveals Gradual and Uncoordinated Transcriptional Reprogramming that Begins before Birth. *Cell Stem Cell* 27, 732-747.e7.
- Lin DS, Tian L, Tomei S, Amann-Zalcenstein D, Baldwin TM, Weber TS, Schreuder J, Stonehouse OJ, Rautela J, Huntington ND, Taoudi S, Ritchie ME, Hodgkin PD, Ng AP, Nutt SL & Naik SH (2021) Single-cell analyses reveal the clonal and molecular aetiology of Flt3L-induced emergency dendritic cell development. *Nat Cell Biol* 23, 219–231.
- Lin F, Karwan M, Saleh B, Hodge DL, Chan T, Boelte KC, Keller JR & Young HA (2014) IFN- $\gamma$  causes aplastic anemia by altering hematopoietic stem/progenitor cell composition and disrupting lineage differentiation. *Blood* 124, 3699–3708.
- Lin KK & Goodell MA (2006) Purification of Hematopoietic Stem Cells Using the Side Population. In *Methods in Enzymology*. Stem Cell Tools and Other Experimental Protocols. Academic Press, pp.255–264. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687906200119> [Accessed December 20, 2022].
- Liu GJ, Cimmino L, Jude JG, Hu Y, Witkowski MT, McKenzie MD, Kartal-Kaess M, Best SA, Tuohey L, Liao Y, Shi W, Mullighan CG, Farrar MA, Nutt SL, Smyth GK, Zuber J & Dickins RA (2014) Pax5 loss imposes a reversible differentiation block in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev.* 28, 1337–1350.
- Liu Y, Chai Y, Kumar A, Tidwell RR, Boykin DW & Wilson WD (2012) Designed Compounds for Recognition of 10 Base Pairs of DNA with Two AT Binding Sites. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 5290–5299.
- Liu Y, Chen Q, Jeong H-W, Koh BI, Watson EC, Xu C, Stehling M, Zhou B & Adams RH (2022) A specialized bone marrow microenvironment for fetal haematopoiesis. *Nat Commun* 13, 1327.

- Loeffler D, Schneiter F, Wang W, Wehling A, Kull T, Lengerke C, Manz MG & Schroeder T (2022) Asymmetric organelle inheritance predicts human blood stem cell fate. *Blood* 139, 2011–2023.
- Loeffler D, Wehling A, Schneiter F, Zhang Y, Müller-Böttcher N, Hoppe PS, Hilsenbeck O, Kokkaliaris KD, Ende M & Schroeder T (2019) Asymmetric lysosome inheritance predicts activation of haematopoietic stem cells. *Nature* 573, 426–429.
- Lord JD, McIntosh BC, Greenberg PD & Nelson BH (2000) The IL-2 Receptor Promotes Lymphocyte Proliferation and Induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x Genes Through the trans-Activation Domain of Stat51. *The Journal of Immunology* 164, 2533–2541.
- Lutz K, Musumeci A, Sie C, Dursun E, Winheim E, Bagnoli J, Ziegenhain C, Rausch L, Bergen V, Luecken MD, Oostendorp RAJ, Schraml BU, Theis FJ, Enard W, Korn T & Krug AB (2022) Ly6D+Siglec-H+ precursors contribute to conventional dendritic cells via a Zbtb46+Ly6D+ intermediary stage. *Nat Commun* 13, 3456.
- Ma C, Witkowski MT, Harris J, Dolgalev I, Sreeram S, Qian W, Tong J, Chen X, Aifantis I & Chen W (2020) Leukemia-on-a-chip: Dissecting the chemoresistance mechanisms in B cell acute lymphoblastic leukemia bone marrow niche. *Science Advances* 6, eaba5536.
- Ma S, Wang S, Ye Y, Ren J, Chen R, Li W, Li J, Zhao L, Zhao Q, Sun G, Jing Y, Zuo Y, Xiong M, Yang Y, Wang Q, Lei J, Sun S, Long X, Song M, Yu S, Chan P, Wang J, Zhou Q, Belmonte JCI, Qu J, Zhang W & Liu G-H (2022) Heterochronic parabiosis induces stem cell revitalization and systemic rejuvenation across aged tissues. *Cell Stem Cell* 29, 990-1005.e10.
- Ma S, Zhang B, LaFave LM, Earl AS, Chiang Z, Hu Y, Ding J, Brack A, Kartha VK, Tay T, Law T, Lareau C, Hsu Y-C, Regev A & Buenrostro JD (2020) Chromatin Potential Identified by Shared Single-Cell Profiling of RNA and Chromatin. *Cell* 183, 1103-1116.e20.
- Ma X, Cao X, Zhu L, Li Y, Wang X, Wu B, Wei G & Hui L (2022) Pre-existing chromatin accessibility of switchable repressive compartment delineates cell plasticity. *National Science Review* 9, nwab230.
- Majeti R, Park CY & Weissman IL (2007) Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* 1, 635–645.
- Malin S, McManus S & Busslinger M (2010) STAT5 in B cell development and leukemia. *Curr Opin Immunol* 22, 168–176.
- Malin S, McManus S, Cobaleda C, Novatchkova M, Delogu A, Bouillet P, Strasser A & Busslinger M (2010) Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. *Nat Immunol* 11, 171–179.
- Malumbres M & Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153–166.
- Mandal M, Okoreeh MK, Kennedy DE, Maienschein-Cline M, Ai J, McLean KC, Kaverina N, Veselits M, Aifantis I, Gounari F & Clark MR (2019) CXCR4 signaling directs Igk

- recombination and the molecular mechanisms of late B lymphopoiesis. *Nat Immunol* 20, 1393–1403.
- Mandal M, Powers SE, Ochiai K, Georgopoulos K, Kee BL, Singh H & Clark MR (2009) Ras orchestrates exit from the cell cycle and light-chain recombination during early B cell development. *Nat Immunol* 10, 1110–1117.
- Mann M, Mehta A, de Boer CG, Kowalczyk MS, Lee K, Haldeman P, Rogel N, Knecht AR, Farouq D, Regev A & Baltimore D (2018) Heterogeneous Responses of Hematopoietic Stem Cells to Inflammatory Stimuli Are Altered with Age. *Cell Reports* 25, 2992–3005.e5.
- Markoulaki S, Hanna J, Beard C, Carey BW, Cheng AW, Lengner CJ, Dausman JA, Fu D, Gao Q, Wu S, Cassady JP & Jaenisch R (2009) Transgenic mice with defined combinations of drug-inducible reprogramming factors. *Nat Biotechnol* 27, 169–171.
- Markovic VD, Bouman D, Bayani J, Al-Maghrabi J, Kamel-Reid S & Squire JA (2000) Lack of BCR/ABL reciprocal fusion in variant Philadelphia chromosome translocations: a use of double fusion signal FISH and spectral karyotyping. *Leukemia* 14, 1157–1160.
- Martin E, Girardello R, Dittmar G & Ludwig A (2021) New insights into the organization and regulation of the apical polarity network in mammalian epithelial cells. *The FEBS Journal* 288, 7073–7095.
- Martín-Lorenzo A, Auer F, Chan LN, García-Ramírez I, González-Herrero I, Rodríguez-Hernández G, Bartenhagen C, Dugas M, Gombert M, Ginzler S, Blanco O, Orfao A, Alonso-López D, Rivas JDL, García-Cenador MB, García-Criado FJ, Müschen M, Sánchez-García I, Borkhardt A, Vicente-Dueñas C & Hauer J (2018) Loss of Pax5 Exploits Sca1-BCR-ABLp190 Susceptibility to Confer the Metabolic Shift Essential for pB-ALL. *Cancer Research* 78, 2669–2679.
- Maryanovich M, Zahalka AH, Pierce H, Pinho S, Nakahara F, Asada N, Wei Q, Wang X, Ciero P, Xu J, Leftin A & Frenette PS (2018) Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche. *Nat Med* 24, 782–791.
- McManus S, Ebert A, Salvagiotto G, Medvedovic J, Sun Q, Tamir I, Jaritz M, Tagoh H & Busslinger M (2011) The transcription factor Pax5 regulates its target genes by recruiting chromatin-modifying proteins in committed B cells. *The EMBO Journal* 30, 2388–2404.
- Mehtonen J, Teppo S, Lahnalampi M, Kokko A, Kaukonen R, Oksa L, Bouvy-Liivrand M, Malyukova A, Mäkinen A, Laukkanen S, Mäkinen PI, Rounioja S, Ruusuvoori P, Sangfelt O, Lund R, Lönnberg T, Lohi O & Heinäniemi M (2020) Single cell characterization of B-lymphoid differentiation and leukemic cell states during chemotherapy in ETV6-RUNX1-positive pediatric leukemia identifies drug-targetable transcription factor activities. *Genome Medicine* 12, 99.
- Menendez P, Catalina P, Rodríguez R, Melen GJ, Bueno C, Arriero M, García-Sánchez F, Lassaletta A, García-Sanz R & García-Castro J (2009) Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J Exp Med* 206, 3131–3141.



- Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaour G, Fechina L, Renneville A, Sutton R, Venn NC, Emerenciano M, Pombo-de-Oliveira MS, Barbieri Blunck C, Almeida Lopes B, Zuna J, Trka J, Ballerini P, Lapillonne H, De Braekeleer M, Cazzaniga G, Corral Abascal L, van der Velden VHJ, Delabesse E, Park TS, Oh SH, Silva MLM, Lund-Aho T, Juvonen V, Moore AS, Heidenreich O, Vormoor J, Zerkalenkova E, Olshanskaya Y, Bueno C, Menendez P, Teigler-Schlegel A, zur Stadt U, Lentes J, Göhring G, Kustanovich A, Aleinikova O, Schäfer BW, Kubetzko S, Madsen HO, Gruhn B, Duarte X, Gameiro P, Lippert E, Bidet A, Cayuela JM, Clappier E, Alonso CN, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Archer P, Hancock J, Mörnicke A, Alten J, Schrappe M, Stanulla M, Strehl S, Attarbaschi A, Dworzak M, Haas OA, Panzer-Grümayer R, Sedék L, Szczepański T, Caye A, Suarez L, Cavé H & Marschalek R (2018) The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia* 32, 273–284.
- Miller JP & Allman D (2003) The Decline in B Lymphopoiesis in Aged Mice Reflects Loss of Very Early B-Lineage Precursors 1. *The Journal of Immunology* 171, 2326–2330.
- Min H, Montecino-Rodriguez E & Dorshkind K (2006) Effects of Aging on the Common Lymphoid Progenitor to Pro-B Cell Transition1. *The Journal of Immunology* 176, 1007–1012.
- Min IM, Pietramaggiore G, Kim FS, Passegué E, Stevenson KE & Wagers AJ (2008) The Transcription Factor EGR1 Controls Both the Proliferation and Localization of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2, 380–391.
- Mohrin M, Bourke E, Alexander D, Warr MR, Barry-Holson K, Beau MML, Morrison CG & Passegué E (2010) Hematopoietic Stem Cell Quiescence Promotes Error-Prone DNA Repair and Mutagenesis. *Cell Stem Cell* 7, 174–185.
- Molina O, Bataller A, Thampi N, Ribera J, Granada I, Velasco P, Fuster JL & Menéndez P (2021) Near-Haploidy and Low-Hypodiploidy in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: When Less Is Too Much. *Cancers (Basel)* 14, 32.
- Montserrat N, Nivet E, Sancho-Martinez I, Hishida T, Kumar S, Miquel L, Cortina C, Hishida Y, Xia Y, Esteban CR & Izpisua Belmonte JC (2013) Reprogramming of Human Fibroblasts to Pluripotency with Lineage Specifiers. *Cell Stem Cell* 13, 341–350.
- Moore KA, Pytowski B, Witte L, Hicklin D & Lemischka IR (1997) Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 4011–4016.
- Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, Vora A, Mitchell CD & Harrison CJ (2010) Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 11, 429–438.
- Morcos MNF, Zerjatke T, Glauche I, Munz CM, Ge Y, Petzold A, Reinhardt S, Dahl A, Anstee NS, Bogeska R, Milsom MD, Säwén P, Wan H, Bryder D, Roers A & Gerbaulet A (2020) Continuous mitotic activity of primitive hematopoietic stem cells in adult mice. *J Exp Med* 217, e20191284.

- Morrison AM, Nutt SL, Thévenin C, Rolink A & Busslinger M (1998) Loss- and gain-of-function mutations reveal an important role of BSAP (Pax-5) at the start and end of B cell differentiation. *Semin Immunol* 10, 133–142.
- Mullighan CG (2012) Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 122, 3407–3415.
- Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui C-H, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA & Downing JR (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446, 758–764.
- Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA & Downing JR (2008) Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 322, 1377–1380.
- Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LAA, Miller CB, Ma J, Liu W, Cheng C, Schulman BA, Harvey RC, Chen I-M, Clifford RJ, Carroll WL, Reaman G, Bowman WP, Devidas M, Gerhard DS, Yang W, Relling MV, Shurtleff SA, Campana D, Borowitz MJ, Pui C-H, Smith M, Hunger SP, Willman CL, Downing JR, & Children’s Oncology Group (2009) Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 360, 470–480.
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KBS, Ismail Virag J, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA & Field LJ (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664–668.
- Myers RM, Izzo F, Kottapalli S, Prieto T, Dunbar A, Bowman RL, Mimitou EP, Stahl M, Ghaity-Beckley SE, Arandela J, Raviram R, Ganesan S, Mekerishvili L, Hoffman R, Chaligné R, Abdel-Wahab O, Smibert P, Marcellino B, Levine RL & Landau DA (2022) Integrated Single-Cell Genotyping and Chromatin Accessibility Charts JAK2V617F Human Hematopoietic Differentiation. , 2022.05.11.491515. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.05.11.491515v1> [Accessed January 16, 2023].
- Nagel I, Bartels M, Duell J, Oberg H-H, Ussat S, Bruckmueller H, Ottmann O, Pfeifer H, Trautmann H, Gökbuget N, Caliebe A, Kabelitz D, Kneba M, Horst H-A, Hoelzer D, Topp MS, Cascorbi I, Siebert R & Brüggemann M (2017) Hematopoietic stem cell involvement in BCR-ABL1-positive ALL as a potential mechanism of resistance to blinatumomab therapy. *Blood* 130, 2027–2031.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N & Yamanaka S (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26, 101–106.
- Nakayama J, Yamamoto M, Hayashi K, Satoh H, Bundo K, Kubo M, Goitsuka R, Farrar MA & Kitamura D (2009) BLNK suppresses pre-B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. *Blood* 113, 1483–1492.

- Nebral K, Denk D, Attarbaschi A, König M, Mann G, Haas OA & Strehl S (2009) Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 23, 134–143.
- Nechanitzky R, Akbas D, Scherer S, Györy I, Hoyler T, Ramamoorthy S, Diefenbach A & Grosschedl R (2013) Transcription factor EBF1 is essential for the maintenance of B cell identity and prevention of alternative fates in committed cells. *Nat Immunol* 14, 867–875.
- Neff T & Armstrong SA (2013) Recent progress toward epigenetic therapies: the example of mixed lineage leukemia. *Blood* 121, 4847–4853.
- Nemazee D (2017) Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* 17, 281–294.
- Ng AP, Coughlan HD, Hediye-zadeh S, Behrens K, Johanson TM, Low MSY, Bell CC, Gilan O, Chan Y-C, Kueh AJ, Boudier T, Feltham R, Gabrielyan A, DiRago L, Hyland CD, Ierino H, Mifsud S, Viney E, Willson T, Dawson MA, Allan RS, Herold MJ, Rogers K, Tarlinton DM, Smyth GK, Davis MJ, Nutt SL & Alexander WS (2020) An Erg-driven transcriptional program controls B cell lymphopoiesis. *Nat Commun* 11, 3013.
- Nishiwaki S, Kim JH, Ito M, Maeda M, Okuno Y, Koyama D, Ozawa Y, Gunji M, Osaki M, Kitamura K, Ushijima Y, Ishikawa Y, Miyamura K, Sugiura I & Kiyoi H (2020) Multi-Lineage BCR-ABL Expression in Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Is Associated With Improved Prognosis but No Specific Molecular Features. *Frontiers in Oncology* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.586567> [Accessed December 30, 2022].
- Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I & Dick JE (2011) Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment. *Science* 333, 218–221.
- Nutt SL, Heavey B, Rolink AG & Busslinger M (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556–562.
- Nutt SL, Morrison AM, Dörfler P, Rolink A & Busslinger M (1998) Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO J* 17, 2319–2333.
- Ochiai K, Maienschein-Cline M, Mandal M, Triggs JR, Bertolino E, Sciammas R, Dinner AR, Clark MR & Singh H (2012) A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nat Immunol* 13, 300–307.
- Ohki K, Kiyokawa N, Saito Y, Hirabayashi S, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, Yoshimi A, Ogata-Kawata H, Sakamoto H, Kato M, Fukushima K, Hasegawa D, Fukushima H, Imai M, Kajiwara R, Koike T, Komori I, Matsui A, Mori M, Moriwaki K, Noguchi Y, Park M, Ueda T, Yamamoto S, Matsuda K, Yoshida T, Matsumoto K, Hata K, Kubo M, Matsubara Y, Takahashi H, Fukushima T, Hayashi Y, Koh K, Manabe A & Ohara A (2019) Clinical and molecular characteristics of MEF2D fusion-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in childhood, including a novel translocation resulting in MEF2D-HNRNPH1 gene fusion. *Haematologica* 104, 128–137.

- Ohnishi K & Melchers F (2003) The nonimmunoglobulin portion of  $\lambda 5$  mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nat Immunol* 4, 849–856.
- Oki T, Nishimura K, Kitaura J, Togami K, Maehara A, Izawa K, Sakaue-Sawano A, Niida A, Miyano S, Aburatani H, Kiyonari H, Miyawaki A & Kitamura T (2014) A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K<sup>-</sup>, identifies quiescent cells and visualizes G0–G1 transition. *Sci Rep* 4, 4012.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C & Keller G (1999) Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073–5084.
- Pang Z, Raudonis R, McCormick C & Cheng Z (2019) Early Growth Response 1 Deficiency Protects the Host against *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *Infection and Immunity* 88, e00678-19.
- Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, Potter NE, Wedge DC, Tubio J, Alexandrov LB, Van Loo P, Cooke SL, Marshall J, Martincorena I, Hinton J, Gundem G, van Delft FW, Nik-Zainal S, Jones DR, Ramakrishna M, Tittley I, Stebbings L, Leroy C, Menzies A, Gamble J, Robinson B, Mudie L, Raine K, O’Meara S, Teague JW, Butler AP, Cazzaniga G, Biondi A, Zuna J, Kempinski H, Muschen M, Ford AM, Stratton MR, Greaves M & Campbell PJ (2014) RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 46, 116–125.
- Passet M, Boissel N, Sigaux F, Saillard C, Bargetzi M, Ba I, Thomas X, Graux C, Chalandon Y, Leguay T, Lengliné E, Konopacki J, Quentin S, Delabesse E, Lafage-Pochitaloff M, Pastoret C, Grardel N, Asnafi V, Lhéritier V, Soulier J, Dombret H & Clappier E (2019) PAX5 P80R mutation identifies a novel subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with favorable outcome. *Blood* 133, 280–284.
- Passet M, Kim R, Gachet S, Sigaux F, Chaumeil J, Galland A, Sexton T, Quentin S, Hernandez L, Larcher L, Bergugnat H, Ye T, Karasu N, Caye A, Heizmann B, Duluc I, Chevallier P, Rousselot P, Hugué F, Leguay T, Hunault M, Pflumio F, Freund J-N, Lobry C, Lhéritier V, Dombret H, Domon-Dell C, Soulier J, Boissel N & Clappier E (2022) Concurrent CDX2 cis-deregulation and UBTF::ATXN7L3 fusion define a novel high-risk subtype of B-cell ALL. *Blood* 139, 3505–3518.
- Penn PE, Jiang DZ, Fei RG, Sitnicka E & Wolf NS (1993) Dissecting the hematopoietic microenvironment. IX. Further characterization of murine bone marrow stromal cells. *Blood* 81, 1205–1213.
- Pereira JP, An J, Xu Y, Huang Y & Cyster JG (2009) Cannabinoid receptor 2 mediates the retention of immature B cells in bone marrow sinusoids. *Nat Immunol* 10, 403–411.
- Pham K, Sacirbegovic F & Russell S (2014) Polarized Cells, Polarized Views: Asymmetric Cell Division in Hematopoietic Cells. *Frontiers in immunology* 5, 26.
- Pi W-C, Wang J, Shimada M, Lin J-W, Geng H, Lee Y-L, Lu R, Li D, Wang GG, Roeder RG & Chen W-Y (2020) E2A-PBX1 functions as a coactivator for RUNX1 in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 136, 11–23.

- Pietras EM, Lakshminarasimhan R, Techner J-M, Fong S, Flach J, Binnewies M & Passegué E (2014) Re-entry into quiescence protects hematopoietic stem cells from the killing effect of chronic exposure to type I interferons. *Journal of Experimental Medicine* 211, 245–262.
- Pietras EM, Mirantes-Barbeito C, Fong S, Loeffler D, Kovtonyuk LV, Zhang S, Lakshminarasimhan R, Chin CP, Techner J-M, Will B, Nerlov C, Steidl U, Manz MG, Schroeder T & Passegué E (2016) Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat Cell Biol* 18, 607–618.
- Pietras EM, Reynaud D, Kang Y-A, Carlin D, Calero-Nieto FJ, Leavitt AD, Stuart JM, Göttgens B & Passegué E (2015) Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions. *Cell Stem Cell* 17, 35–46.
- Pineault N & Boyer L (2011) Cellular-based therapies to prevent or reduce thrombocytopenia. *Transfusion* 51 Suppl 4, 72S-81S.
- Pinho S, Marchand T, Yang E, Wei Q, Nerlov C & Frenette PS (2018) Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells Are Regulated by Distinct Niches. *Developmental Cell* 44, 634-641.e4.
- Pinz S, Unser S & Rasclé A (2016) Signal transducer and activator of transcription STAT5 is recruited to c-Myc super-enhancer. *BMC Molecular Biol* 17, 1–11.
- Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li Y, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T & Hochedlinger K (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28, 848–855.
- Pui CH, Crist WM & Look AT (1990) Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 76, 1449–1463.
- Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Månsson R, Thoren LA, Ekblom M, Alexander WS & Jacobsen SEW (2007) Critical Role of Thrombopoietin in Maintaining Adult Quiescent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 1, 671–684.
- Radtke AJ, Chu CJ, Yaniv Z, Yao L, Marr J, Beuschel RT, Ichise H, Gola A, Kabat J, Lowekamp B, Speranza E, Croteau J, Thakur N, Jonigk D, Davis JL, Hernandez JM & Germain RN (2022) IBEX: an iterative immunolabeling and chemical bleaching method for high-content imaging of diverse tissues. *Nat Protoc* 17, 378–401.
- Radtke AJ, Kandov E, Lowekamp B, Speranza E, Chu CJ, Gola A, Thakur N, Shih R, Yao L, Yaniv ZR, Beuschel RT, Kabat J, Croteau J, Davis J, Hernandez JM & Germain RN (2020) IBEX: A versatile multiplex optical imaging approach for deep phenotyping and spatial analysis of cells in complex tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 33455–33465.
- Ramadani F, Bolland DJ, Garcon F, Emery JL, Vanhaesebroeck B, Corcoran AE & Okkenhaug K (2010) The PI3K Isoforms p110 $\alpha$  and p110 $\delta$  are Essential for Pre-B Cell Receptor Signaling and B Cell Development. *Sci Signal* 3, ra60.

- Ramamoorthy S, Kometani K, Herman JS, Bayer M, Boller S, Edwards-Hicks J, Ramachandran H, Li R, Klein-Geltink R, Pearce EL, Grün D & Grosschedl R (2020) EBF1 and Pax5 safeguard leukemic transformation by limiting IL-7 signaling, Myc expression, and folate metabolism. *Genes Dev* 34, 1503–1519.
- Ramsfjell V, Borge OJ, Veiby OP, Cardier J, Murphy MJ, Lyman SD, Lok S & Jacobsen SEW (1996) Thrombopoietin, But Not Erythropoietin, Directly Stimulates Multilineage Growth of Primitive Murine Bone Marrow Progenitor Cells in Synergy With Early Acting Cytokines: Distinct Interactions With the Ligands for c-kit and FLT3. *Blood* 88, 4481–4492.
- Ravandi F, Jorgensen JL, O'Brien SM, Jabbour E, Thomas DA, Borthakur G, Garris R, Huang X, Garcia-Manero G, Burger JA, Ferrajoli A, Wierda W, Kadia T, Jain N, Wang SA, Konoplev S, Kebriaei P, Champlin RE, McCue D, Estrov Z, Cortes JE & Kantarjian HM (2016) Minimal residual disease assessed by multi-parameter flow cytometry is highly prognostic in adult patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 172, 392–400.
- Renders S, Svendsen AF, Panten J, Rama N, Maryanovich M, Sommerkamp P, Ladel L, Redavid AR, Gibert B, Lazare S, Ducarouge B, Schönberger K, Narr A, Tourbez M, Dethmers-Ausema B, Zwart E, Hotz-Wagenblatt A, Zhang D, Korn C, Zeisberger P, Przybylla A, Sohn M, Mendez-Ferrer S, Heikenwälder M, Brune M, Klimmeck D, Bystrykh L, Frenette PS, Mehlen P, de Haan G, Cabezas-Wallscheid N & Trumpp A (2021) Niche derived netrin-1 regulates hematopoietic stem cell dormancy via its receptor neogenin-1. *Nat Commun* 12, 608.
- Revilla-i-Domingo R, Bilic I, Vilagos B, Tagoh H, Ebert A, Tamir IM, Smeenk L, Trupke J, Sommer A, Jaritz M & Busslinger M (2012) The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcriptional programmes in early and late B lymphopoiesis. *The EMBO Journal* 31, 3130–3146.
- Richardson SE, Ghazanfari R, Chhetri J, Enver T & Böiers C (2021) In vitro differentiation of human pluripotent stem cells into the B lineage using OP9-MS5 co-culture. *STAR Protocols* 2, 100420.
- Roberts KG (2018) Genetics and prognosis of ALL in children vs adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2018, 137–145.
- Rodríguez-Hernández G, Casado-García A, Isidro-Hernández M, Picard D, Raboso-Gallego J, Alemán-Arteaga S, Orfao A, Blanco O, Riesco S, Prieto-Matos P, García Criado FJ, García Cenador MB, Hock H, Enver T, Sanchez-Garcia I & Vicente-Dueñas C (2021) The Second Oncogenic Hit Determines the Cell Fate of ETV6-RUNX1 Positive Leukemia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.704591> [Accessed December 25, 2022].
- Rolink A & Melchers F (1996) B-cell development in the mouse. *Immunology Letters* 54, 157–161.
- Rolink AG, Nutt SL, Melchers F & Busslinger M (1999) Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* 401, 603–606.

- Rolink AG, Winkler T, Melchers F & Andersson J (2000) Precursor B Cell Receptor–Dependent B Cell Proliferation and Differentiation Does Not Require the Bone Marrow or Fetal Liver Environment. *Journal of Experimental Medicine* 191, 23–32.
- Rossi B, Espeli M, Schiff C & Gauthier L (2006) Clustering of Pre-B Cell Integrins Induces Galectin-1-Dependent Pre-B Cell Receptor Relocalization and Activation1. *The Journal of Immunology* 177, 796–803.
- Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ & Weissman IL (2005) Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 9194–9199.
- Rowe JM, Buck G, Burnett AK, Chopra R, Wiernik PH, Richards SM, Lazarus HM, Franklin IM, Litzow MR, Ciobanu N, Prentice HG, Durrant J, Tallman MS, Goldstone AH, & for ECOG and the MRC/NCRI Adult Leukemia Working Party (2005) Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood* 106, 3760–3767.
- Roybon L, Ma Z, Asztely F, Fossum A, Jacobsen SEW, Brundin P & Li J-Y (2006) Failure of Transdifferentiation of Adult Hematopoietic Stem Cells into Neurons. *Stem Cells* 24, 1594–1604.
- Ru H, Chambers MG, Fu T-M, Tong AB, Liao M & Wu H (2015) Molecular Mechanism of V(D)J Recombination from Synaptic RAG1-RAG2 Complex Structures. *Cell* 163, 1138–1152.
- Rumfelt LL, Zhou Y, Rowley BM, Shinton SA & Hardy RR (2006) Lineage specification and plasticity in CD19– early B cell precursors. *Journal of Experimental Medicine* 203, 675–687.
- Saçma M, Pospiech J, Bogeska R, de Back W, Mallm J-P, Sakk V, Soller K, Marka G, Vollmer A, Karns R, Cabezas-Wallscheid N, Trumpp A, Méndez-Ferrer S, Milsom MD, Mulaw MA, Geiger H & Florian MC (2019) Haematopoietic stem cells in perisinusoidal niches are protected from ageing. *Nat Cell Biol* 21, 1309–1320.
- Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H & Miyawaki A (2008) Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell* 132, 487–498.
- Sandoval GJ, Graham DB, Bhattacharya D, Sleckman BP, Xavier RJ & Swat W (2013) Cutting Edge: Cell-Autonomous Control of IL-7 Response Revealed in a Novel Stage of Precursor B Cells. *The Journal of Immunology* 190, 2485–2489.
- Sanjuan-Pla A, Macaulay IC, Jensen CT, Woll PS, Luis TC, Mead A, Moore S, Carella C, Matsuoka S, Jones TB, Chowdhury O, Stenson L, Lutteropp M, Green JCA, Facchini R, Boukarabila H, Grover A, Gambardella A, Thongjuea S, Carrelha J, Tarrant P, Atkinson D, Clark S-A, Nerlov C & Jacobsen SEW (2013) Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* 502, 232–236.

- Saygin C, Cannova J, Stock W & Muffly L (2022) Measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia: methods and clinical context in adult patients. *Haematologica* 107, 2783–2793.
- Schaniel C, Bruno L, Melchers F & Rolink AG (2002) Multiple hematopoietic cell lineages develop in vivo from transplanted Pax5-deficient pre-B I-cell clones. *Blood* 99, 472–478.
- Schebesta M, Pfeffer PL & Busslinger M (2002) Control of Pre-BCR Signaling by Pax5-Dependent Activation of the BLNK Gene. *Immunity* 17, 473–485.
- Scheicher R, Hoelbl-Kovacic A, Bellutti F, Tigan A-S, Prchal-Murphy M, Heller G, Schneckenleithner C, Salazar-Roa M, Zöchbauer-Müller S, Zuber J, Malumbres M, Kollmann K & Sexl V (2015) CDK6 as a key regulator of hematopoietic and leukemic stem cell activation. *Blood* 125, 90–101.
- Schoedel KB, Morcos MNF, Zerjatke T, Roeder I, Grinenko T, Voehringer D, Göthert JR, Waskow C, Roers A & Gerbaulet A (2016) The bulk of the hematopoietic stem cell population is dispensable for murine steady-state and stress hematopoiesis. *Blood* 128, 2285–2296.
- Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.
- Schönberger K, Obier N, Romero-Mulero MC, Cauchy P, Mess J, Pavlovich PV, Zhang YW, Mitterer M, Rettkowski J, Lalioti M-E, Jäcklein K, Curtis JD, Féret B, Sommerkamp P, Morganti C, Ito K, Ghyselinck NB, Trompouki E, Buescher JM, Pearce EL & Cabezas-Wallscheid N (2022) Multilayer omics analysis reveals a non-classical retinoic acid signaling axis that regulates hematopoietic stem cell identity. *Cell Stem Cell* 29, 131-148.e10.
- Schuettpeitz LG, Borgerding JN, Christopher MJ, Gopalan PK, Romine MP, Herman AC, Woloszynek JR, Greenbaum AM & Link DC (2014) G-CSF regulates hematopoietic stem cell activity, in part, through activation of Toll-like receptor signaling. *Leukemia* 28, 1851–1860.
- Schultz KR, Carroll A, Heerema NA, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, Sather H, Devidas M, Zheng HW, Davies SM, Gaynon PS, Trigg M, Rutledge R, Jorstad D, Winick N, Borowitz MJ, Hunger SP, Carroll WL, Camitta B, & Children’s Oncology Group (2014) Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children’s Oncology Group study AALL0031. *Leukemia* 28, 1467–1471.
- Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, Carroll AJ, Heerema NA, Rubnitz JE, Loh ML, Raetz EA, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL, Gaynon PS & Camitta BM (2007) Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children’s Cancer Group (CCG). *Blood* 109, 926–935.
- Secker-Walker LM, Prentice HG, Durrant J, Richards S, Hall E & Harrison G (1997) Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute



- lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA. MRC Adult Leukaemia Working Party. *Br J Haematol* 96, 601–610.
- Seggewiss R & Einsele H (2010) Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 115, 3861–3868.
- Sheikh BN, Yang Y, Schreuder J, Nilsson SK, Bilardi R, Carotta S, McRae HM, Metcalf D, Voss AK & Thomas T (2016) MOZ (KAT6A) is essential for the maintenance of classically defined adult hematopoietic stem cells. *Blood* 128, 2307–2318.
- Shen S, Chen X, Cai J, Yu J, Gao J, Hu S, Zhai X, Liang C, Ju X, Jiang H, Jin R, Wu X, Wang N, Tian X, Pan K, Jiang H, Sun L, Fang Y, Li C-K, Hu Q, Yang M, Zhu Y, Zhang H, Li C, Pei D, Jeha S, Yang JJ, Cheng C, Tang J, Zhu X & Pui C-H (2020) Effect of Dasatinib vs Imatinib in the Treatment of Pediatric Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 6, 358–366.
- Shu J, Wu C, Wu Y, Li Z, Shao S, Zhao W, Tang X, Yang H, Shen L, Zuo X, Yang W, Shi Y, Chi X, Zhang H, Gao G, Shu Y, Yuan K, He W, Tang C, Zhao Y & Deng H (2013) Induction of Pluripotency in Mouse Somatic Cells with Lineage Specifiers. *Cell* 153, 963–975.
- Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL & Handgretinger R (2005) Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174, 6477–6489.
- Sieweke MH & Allen JE (2013) Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages. *Science* 342, 1242974.
- Siller KH & Doe CQ (2009) Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* 11, 365–374.
- Smeenk L, Fischer M, Jurado S, Jaritz M, Azaryan A, Werner B, Roth M, Zuber J, Stanulla M, den Boer ML, Mullighan CG, Strehl S & Busslinger M (2017) Molecular role of the PAX5-ETV6 oncoprotein in promoting B-cell acute lymphoblastic leukemia. *EMBO J* 36, 718–735.
- Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, Gelber R, Heerema N, Korn EL, Link M, Murphy S, Pui CH, Pullen J, Reamon G, Sallan SE, Sather H, Shuster J, Simon R, Trigg M, Tubergen D, Uckun F & Ungerleider R (1996) Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 14, 18–24.
- Soares-da-Silva F, Freyer L, Elsaid R, Burlen-Defranoux O, Iturri L, Sismeiro O, Pinto-do-Ó P, Gomez-Perdiguerro E & Cumano A (2021) Yolk sac, but not hematopoietic stem cell-derived progenitors, sustain erythropoiesis throughout murine embryonic life. *J Exp Med* 218, e20201729.
- Soerens AG, Künzli M, Quarnstrom CF, Scott MC, Swanson L, Locquiao JJ, Ghoneim HE, Zehn D, Youngblood B, Vezys V & Masopust D (2023) Functional T cells are capable of supernumerary cell division and longevity. *Nature*, 1–5.

- Song X, Call GB, Kirilly D & Xie T (2007) Notch signaling controls germline stem cell niche formation in the *Drosophila* ovary. *Development* 134, 1071–1080.
- Song Y, Soto J, Wang P, An Q, Zhang X, Hong S, Lee LP, Fan G, Yang L & Li S (2021) Asymmetric Cell Division of Fibroblasts is An Early Deterministic Step to Generate Elite Cells during Cell Reprogramming. *Advanced Science* 8, 2003516.
- Souabni A, Cobaleda C, Schebesta M & Busslinger M (2002) Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17, 781–793.
- Spangrude GJ, Heimfeld S & Weissman IL (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58–62.
- Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Horvath S, Zhou Q & Plath K (2009) Role of the Murine Reprogramming Factors in the Induction of Pluripotency. *Cell* 136, 364–377.
- Stadtfeld M, Maherali N, Borkent M & Hochedlinger K (2010) A reprogrammable mouse strain from gene-targeted embryonic stem cells. *Nat Methods* 7, 53–55.
- Stassen SV, Yip GGK, Wong KKY, Ho JWK & Tsia KK (2021) Generalized and scalable trajectory inference in single-cell omics data with VIA. *Nat Commun* 12, 5528.
- Stewart JB & Chinnery PF (2015) The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet* 16, 530–542.
- Stoddart A, Fernald AA, Davis EM, McNerney ME & Le Beau MM (2022) EGR1 Haploinsufficiency Confers a Fitness Advantage to Hematopoietic Stem Cells Following Chemotherapy. *Exp Hematol* 115, 54–67.
- Stoeger T, Grant RA, McQuattie-Pimentel AC, Anekalla KR, Liu SS, Tejedor-Navarro H, Singer BD, Abdala-Valencia H, Schwake M, Tetreault M-P, Perlman H, Balch WE, Chandel NS, Ridge KM, Sznajder JI, Morimoto RI, Misharin AV, Budinger GRS & Nunes Amaral LA (2022) Aging is associated with a systemic length-associated transcriptome imbalance. *Nat Aging* 2, 1191–1206.
- Su Y & Jumaa H (2003) LAT links the pre-BCR to calcium signaling. *Immunity* 19, 295–305.
- Subramaniam A, Žemaitis K, Talkhoncheh MS, Yudovich D, Bäckström A, Debnath S, Chen J, Jain MV, Galeev R, Gaetani M, Zubarev RA & Larsson J (2020) Lysine-specific demethylase 1A restricts ex vivo propagation of human HSCs and is a target of UM171. *Blood* 136, 2151–2161.
- Sudo K, Ema H, Morita Y & Nakauchi H (2000) Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192, 1273–1280.
- Suelves M, Carrió Gaspar E, Núñez Álvarez Y & Peinado M (2016) DNA methylation dynamics in cellular commitment and differentiation. *Briefings in functional genomics* 15.
- Sun J, Ramos A, Chapman B, Johnnidis JB, Le L, Ho Y-J, Klein A, Hofmann O & Camargo FD (2014) Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature* 514, 322–327.

- Swaminathan S, Klemm L, Park E, Papaemmanuil E, Ford A, Kweon S-M, Trageser D, Hasselfeld B, Henke N, Mooster J, Geng H, Schwarz K, Kogan SC, Casellas R, Schatz DG, Lieber MR, Greaves MF & Müschen M (2015) Mechanisms of clonal evolution in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol* 16, 766–774.
- Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, Levadoux-Martin M & Bhatia M (2010) Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 468, 521–526.
- Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takizawa H, Regoes RR, Boddupalli CS, Bonhoeffer S & Manz MG (2011) Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 208, 273–284.
- Taylor S, Stauber J, Bohorquez O, Schwenger E, Boykin D, Poon G & Steidl U (2022) 2020 – DIRECT PHARMACOLOGICAL REDISTRIBUTION OF THE MASTER TRANSCRIPTION FACTOR PU.1. *Experimental Hematology* 111, S41.
- Tchilian EZ & Beverley PCL (2006) Altered CD45 expression and disease. *Trends in Immunology* 27, 146–153.
- Teng M, Lu W, Donovan KA, Sun J, Krupnick NM, Nowak RP, Li Y-D, Sperling AS, Zhang T, Ebert BL, Fischer ES & Gray NS (2022) Development of PDE6D and CK1 $\alpha$  Degradors through Chemical Derivatization of FPFT-2216. *J Med Chem* 65, 747–756.
- Thaunat O, Granja AG, Barral P, Filby A, Montaner B, Collinson L, Martinez-Martin N, Harwood NE, Bruckbauer A & Batista FD (2012) Asymmetric Segregation of Polarized Antigen on B Cell Division Shapes Presentation Capacity. *Science* 335, 475–479.
- de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L & Dejean A (1990) The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor  $\alpha$  gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347, 558–561.
- Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, Sobral da Costa E, Kotrová M, Novakova M, Sonneveld E, Buracchi C, Bonaccorso P, Oliveira E, te Marvelde JG, Szczepanski T, Lhermitte L, Hrusak O, Lecrevisse Q, Grigore GE, Froňková E, Trka J, Brüggemann M, Orfao A, van Dongen JJM, van der Velden VHJ, & on behalf of the EuroFlow Consortium (2017) Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 129, 347–357.
- Thomas X, Boiron J-M, Huguet F, Dombret H, Bradstock K, Vey N, Kovacsovics T, Delannoy A, Fegueux N, Fenaux P, Stamatoullas A, Vernant J-P, Tournilhac O, Buzyn A, Reman O, Charrin C, Boucheix C, Gabert J, Lhéritier V & Fiere D (2004) Outcome of Treatment in Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia: Analysis of the LALA-94 Trial. *JCO* 22, 4075–4086.
- Thorén LA, Liuba K, Bryder D, Nygren JM, Jensen CT, Qian H, Antonchuk J & Jacobsen S-EW (2008) Kit Regulates Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology* 180, 2045–2053.

- Tikhonova AN, Dolgalev I, Hu H, Sivaraj KK, Hoxha E, Cuesta-Domínguez Á, Pinho S, Akhmetzyanova I, Gao J, Witkowski M, Guillaumot M, Gutkin MC, Zhang Y, Marier C, Diefenbach C, Kousteni S, Heguy A, Zhong H, Fooksman DR, Butler JM, Economides A, Frenette PS, Adams RH, Satija R, Tsiganos A & Aifantis I (2019) The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature* 569, 222–228.
- Till JE & McCULLOCH EA (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213–222.
- Tomura M, Sakaue-Sawano A, Mori Y, Takase-Utsugi M, Hata A, Ohtawa K, Kanagawa O & Miyawaki A (2013) Contrasting Quiescent G0 Phase with Mitotic Cell Cycling in the Mouse Immune System. *PLOS ONE* 8, e73801.
- Tremblay CS, Saw J, Chiu SK, Wong NC, Tsyganov K, Ghotb S, Graham AN, Yan F, Guirguis AA, Sonderegger SE, Lee N, Kalitsis P, Reynolds J, Ting SB, Powell DR, Jane SM & Curtis DJ (2018) Restricted cell cycle is essential for clonal evolution and therapeutic resistance of pre-leukemic stem cells. *Nat Commun* 9, 3535.
- Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M & Fuchs E (2004) Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. *Science* 303, 359–363.
- Turati VA, Guerra-Assunção JA, Potter NE, Gupta R, Ecker S, Daneviciute A, Tarabichi M, Webster AP, Ding C, May G, James C, Brown J, Conde L, Russell LJ, Ancliff P, Inglott S, Cazzaniga G, Biondi A, Hall GW, Lynch M, Hubank M, Macaulay I, Beck S, Van Loo P, Jacobsen SE, Greaves M, Herrero J & Enver T (2021) Chemotherapy induces canalization of cell state in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Cancer* 2, 835–852.
- Turner M, Joseph Mee P, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL & Tybulewicz VLJ (1995) Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378, 298–302.
- Ungerbäck J, Åhsberg J, Strid T, Somasundaram R & Sigvardsson M (2015) Combined heterozygous loss of Ebf1 and Pax5 allows for T-lineage conversion of B cell progenitors. *J Exp Med* 212, 1109–1123.
- Urbanczyk S, Stein M, Schuh W, Jäck H-M, Mougiakakos D & Mielenz D (2018) Regulation of Energy Metabolism during Early B Lymphocyte Development. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 2192.
- Utikal J, Maherali N, Kulalert W & Hochedlinger K (2009) Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *Journal of Cell Science* 122, 3502–3510.
- Vallespinós M, Fernandez-Antoran D, Rodríguez L, Alvaro-Blanco J, Baena E, Ortiz-Virumbrales M, Dukovska D, Martinez L, Rojas Mendoza A, Campanero M & Moreno de Alborán I (2011) B Lymphocyte Commitment Program Is Driven by the Proto-Oncogene c-myc. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186, 6726–36.
- Velten L, Haas SF, Raffel S, Blaszkiewicz S, Islam S, Hennig BP, Hirche C, Lutz C, Buss EC, Nowak D, Boch T, Hofmann W-K, Ho AD, Huber W, Trumpp A, Essers MAG &

- Steinmetz LM (2017) Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol* 19, 271–281.
- Velten L, Story BA, Hernández-Malmierca P, Raffel S, Leonce DR, Milbank J, Paulsen M, Demir A, Szu-Tu C, Frömel R, Lutz C, Nowak D, Jann J-C, Pabst C, Boch T, Hofmann W-K, Müller-Tidow C, Trumpp A, Haas S & Steinmetz LM (2021) Identification of leukemic and pre-leukemic stem cells by clonal tracking from single-cell transcriptomics. *Nat Commun* 12, 1366.
- Velychko S, Adachi K, Kim K-P, Hou Y, MacCarthy CM, Wu G & Schöler HR (2019) Excluding Oct4 from Yamanaka Cocktail Unleashes the Developmental Potential of iPSCs. *Cell Stem Cell* 25, 737-753.e4.
- Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA & Goodell MA (2004) Molecular Signatures of Proliferation and Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. *PLOS Biology* 2, e301.
- Victorelli S & Passos JF (2017) Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine* 21, 14–20.
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC & Wernig M (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035–1041.
- Vu T, Straube J, Porter AH, Bywater M, Song A, Ling V, Cooper L, Pali G, Bruedigam C, Jacquelin S, Green J, Magor G, Perkins A, Chalk AM, Walkley CR, Heidel FH, Mukhopadhyay P, Cloonan N, Gröschel S, Mallm J-P, Fröhling S, Scholl C & Lane SW (2020) Hematopoietic stem and progenitor cell-restricted Cdx2 expression induces transformation to myelodysplasia and acute leukemia. *Nat Commun* 11, 3021.
- Waanders E, Gu Z, Dobson SM, Antić Ž, Crawford JC, Ma X, Edmonson MN, Payne-Turner D, van de Vorst M, Jongmans MCJ, McGuire I, Zhou X, Wang J, Shi L, Pounds S, Pei D, Cheng C, Song G, Fan Y, Shao Y, Rusch M, McCastlain K, Yu J, van Boxtel R, Blokzijl F, Iacobucci I, Roberts KG, Wen J, Wu G, Ma J, Easton J, Neale G, Olsen SR, Nichols KE, Pui C-H, Zhang J, Evans WE, Relling MV, Yang JJ, Thomas PG, Dick JE, Kuiper RP & Mullighan CG (2020) Mutational Landscape and Patterns of Clonal Evolution in Relapsed Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood Cancer Discovery* 1, 96–111.
- Wagner W, Ansorge A, Wirkner U, Eckstein V, Schwager C, Blake J, Miesala K, Selig J, Saffrich R, Ansorge W & Ho AD (2004) Molecular evidence for stem cell function of the slow-dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis. *Blood* 104, 675–686.
- Wagner W, Saffrich R, Wirkner U, Eckstein V, Blake J, Ansorge A, Schwager C, Wein F, Miesala K, Ansorge W & Ho AD (2005) Hematopoietic Progenitor Cells and Cellular Microenvironment: Behavioral and Molecular Changes upon Interaction. *Stem Cells* 23, 1180–1191.
- Wang X, Dong F, Zhang S, Yang W, Yu W, Wang Z, Zhang S, Wang J, Ma S, Wu P, Gao Y, Dong J, Tang F, Cheng T & Ema H (2018) TGF-β1 Negatively Regulates the Number and Function of Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 11, 274–287.

- Wang Z, Li G, Tse W & Bunting KD (2009) Conditional deletion of STAT5 in adult mouse hematopoietic stem cells causes loss of quiescence and permits efficient nonablative stem cell replacement. *Blood* 113, 4856–4865.
- Weidemann RR, Behrendt R, Schoedel KB, Müller W, Roers A & Gerbault A (2017) Constitutive Kit activity triggers B-cell acute lymphoblastic leukemia-like disease in mice. *Experimental Hematology* 45, 45–55.e6.
- Weissman IL (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287, 1442–1446.
- Whitehead VM, Vuchich MJ, Lauer SJ, Mahoney D, Carroll AJ, Shuster JJ, Esseltine DW, Payment C, Look AT & Akabutu J (1992) Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 80, 1316–1323.
- Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GM, Look AT, Melvin SL, Bowman WP, Kalwinsky DK, Rivera G & Dahl GV (1982) Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 60, 864–871.
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, Wath RC van der, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, MacDonald HR & Trumpp A (2008) Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell* 135, 1118–1129.
- Wilson A, Laurenti E & Trumpp A (2009) Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development* 19, 461–468.
- Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, Pasche A-C, Knabenhans C, MacDonald HR & Trumpp A (2004) c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* 18, 2747–2763.
- Wilson NK, Kent DG, Buettner F, Shehata M, Macaulay IC, Calero-Nieto FJ, Sánchez Castillo M, Oedekoven CA, Diamanti E, Schulte R, Ponting CP, Voet T, Caldas C, Stingl J, Green AR, Theis FJ & Göttgens B (2015) Combined Single-Cell Functional and Gene Expression Analysis Resolves Heterogeneity within Stem Cell Populations. *Cell Stem Cell* 16, 712–724.
- Wossning T, Herzog S, Köhler F, Meixlsperger S, Kulathu Y, Mittler G, Abe A, Fuchs U, Borkhardt A & Jumaa H (2006) Deregulated Syk inhibits differentiation and induces growth factor-independent proliferation of pre-B cells. *Journal of Experimental Medicine* 203, 2829–2840.
- Wray JP, Deltcheva EM, Boiers C, Richardson SE, Chhetri JB, Brown J, Gargica S, Guo Y, Illendula A, Martens JHA, Stunnenberg HG, Bushweller JH, Nimmo R & Enver T (2022) Regulome analysis in B-acute lymphoblastic leukemia exposes Core Binding Factor addiction as a therapeutic vulnerability. *Nat Commun* 13, 7124.

- Wright NJ, Fedor JG, Zhang H, Jeong P, Suo Y, Yoo J, Hong J, Im W & Lee S-Y (2022) Methotrexate recognition by the human reduced folate carrier SLC19A1. *Nature* 609, 1056–1062.
- Wu M, Kwon HY, Rattis F, Blum J, Zhao C, Ashkenazi R, Jackson TL, Gaiano N, Oliver T & Reya T (2007) Imaging Hematopoietic Precursor Division in Real Time. *Cell Stem Cell* 1, 541–554.
- Xie H, Ye M, Feng R & Graf T (2004) Stepwise Reprogramming of B Cells into Macrophages. *Cell* 117, 663–676.
- Xie SZ, Garcia-Prat L, Voisin V, Ferrari R, Gan OI, Wagenblast E, Kaufmann KB, Zeng AGX, Takayanagi S, Patel I, Lee EK, Jargstorf J, Holmes G, Romm G, Pan K, Shoong M, Vedi A, Luberto C, Minden MD, Bader GD, Laurenti E & Dick JE (2019) Sphingolipid Modulation Activates Proteostasis Programs to Govern Human Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell* 25, 639–653.e7.
- Xu W, Yang W, Zhang Y, Chen Y, Hong N, Zhang Q, Wang X, Hu Y, Song K, Jin W & Chen X (2022) ISSAAC-seq enables sensitive and flexible multimodal profiling of chromatin accessibility and gene expression in single cells. *Nat Methods* 19, 1243–1249.
- Yamashita M & Passegué E (2019) TNF- $\alpha$  Coordinates Hematopoietic Stem Cell Survival and Myeloid Regeneration. *Cell Stem Cell* 25, 357–372.e7.
- Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H & Nakauchi H (2009) TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* 113, 1250–1256.
- Yang L, Wang L, Geiger H, Cancelas JA, Mo J & Zheng Y (2007) Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5091–5096.
- Yasuda T, Sanjo H, Pagès G, Kawano Y, Karasuyama H, Pouyssegur J, Ogata M & Kurosaki T (2008) Erk Kinases Link Pre-B Cell Receptor Signaling to Transcriptional Events Required for Early B Cell Expansion. *Immunity* 28, 499–508.
- Yokomizo T, Ideue T, Morino-Koga S, Tham CY, Sato T, Takeda N, Kubota Y, Kurokawa M, Komatsu N, Ogawa M, Araki K, Osato M & Suda T (2022) Independent origins of fetal liver haematopoietic stem and progenitor cells. *Nature* 609, 779–784.
- Yoshida T, Hu Y, Zhang Z, Emmanuel AO, Galani K, Muhire B, Snippert HJ, Williams CJ, Tolstorukov MY, Gounari F & Georgopoulos K (2019) Chromatin restriction by the nucleosome remodeler Mi-2 $\beta$  and functional interplay with lineage-specific transcription regulators control B-cell differentiation. *Genes Dev* 33, 763–781.
- Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyamoto K, Miyazaki H, Takahashi T & Suda T (2007) Thrombopoietin/MPL Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Interaction with the Osteoblastic Niche. *Cell Stem Cell* 1, 685–697.

- Young K, Eudy E, Bell R, Loberg MA, Stearns T, Sharma D, Velten L, Haas S, Filippi M-D & Trowbridge JJ (2021) Decline in IGF1 in the bone marrow microenvironment initiates hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell* 28, 1473-1482.e7.
- Young NS & Maciejewski J (1997) The Pathophysiology of Acquired Aplastic Anemia. *New England Journal of Medicine* 336, 1365–1372.
- Zeng H, Yu M, Tan H, Li Y, Su W, Shi H, Dhungana Y, Guy C, Neale G, Cloer C, Peng J, Wang D & Chi H (2018) Discrete roles and bifurcation of PTEN signaling and mTORC1-mediated anabolic metabolism underlie IL-7-driven B lymphopoiesis. *Science Advances* 4, eaar5701.
- Zhang CC & Lodish HF (2008) Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Current Opinion in Hematology* 15, 307–311.
- Zhang S, Zhang X, Wang K, Xu X, Li M, Zhang J, Zhang Y, Hao J, Sun X, Chen Y, Liu X, Chang Y, Jin R, Wu H & Ge Q (2018) Newly Generated CD4+ T Cells Acquire Metabolic Quiescence after Thymic Egress. *J Immunol* 200, 1064–1077.
- Zhang Y, Wang S, Zhang J, Liu C, Li X, Guo W, Duan Y, Chen X, Zong S, Zheng J, Wu Y, Chen X, Cheng X, Chang Y, Wang Y, Ding F, Yang W, Chen X, Guo Y, Zhang L, Chen Y, Zou Y, Zhu X, Gu J & Cheng T (2022) Elucidating minimal residual disease of paediatric B-cell acute lymphoblastic leukaemia by single-cell analysis. *Nat Cell Biol* 24, 242–252.
- Zhang YW, Mess J, Aizarani N, Mishra P, Johnson C, Romero-Mulero MC, Rettkowski J, Schönberger K, Obier N, Jäcklein K, Woessner NM, Lalioti M-E, Velasco-Hernandez T, Sikora K, Wäsch R, Lehnertz B, Sauvageau G, Manke T, Menendez P, Walter SG, Minguet S, Laurenti E, Günther S, Grün D & Cabezas-Wallscheid N (2022) Hyaluronic acid-GPRC5C signalling promotes dormancy in haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* 24, 1038–1048.
- Zhang Z, Cotta CV, Stephan RP, deGuzman CG & Klug CA (2003) Enforced expression of EBF in hematopoietic stem cells restricts lymphopoiesis to the B cell lineage. *The EMBO Journal* 22, 4759–4769.
- Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai Z-C & Guan K-L (2007) Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 21, 2747–2761.
- Zhou B, Chu X, Tian H, Liu T, Liu H, Gao W, Chen S, Hu S, Wu D & Xu Y (2021) The Clinical Outcomes and Genomic Landscapes of Acute Lymphoblastic Leukemia Patients with E2A-PBX1: A 10-Year Retrospective Study. *Blood* 138, 212.
- Zimdahl B, Ito T, Blevins A, Bajaj J, Konuma T, Weeks J, Koechlein CS, Kwon HY, Arami O, Rizzieri D, Broome HE, Chuah C, Oehler VG, Sasik R, Hardiman G & Reya T (2014) *Lis1* regulates asymmetric division in hematopoietic stem cells and in leukemia. *Nat Genet* 46, 245–252.



Zuna J, Madzo J, Krejci O, Zemanova Z, Kalinova M, Muzikova K, Zápotocký M, Starkova J, Hrusak O, Horak J & Trka J (2011) ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia. *Blood* 117, 368–9; author reply 370.

